DIE ZELLREKRUTIERUNGSKAPAZITÄT VON VERSCHIEDENEN LYMPHOZYTENPOPULATIONEN IN VIVO

Untersuchungen zur lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate bei der Maus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Kerstin Thiede
aus Bad Sachsa

1984

RIJKS-
HERB.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0011

DIE ZELLREKRUTIERUNGSKAPAZITÄT VON VERSCHIEDENEN LYMPHOZYTENPOPULATIONEN IN VIVO

Untersuchungen zur lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate bei der Maus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
Kerstin Thiede
aus Bad Sachsa

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	28. Juni 1984
Dekan:	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. Bockhorn
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Bessler

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meinen Eltern,

die mir durch die Vermittlung einer positiven Arbeitseinstellung und eines großen Frohsinns den Weg bis zu diesem Abschluß sehr erleichtert haben.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Chirurgischen Klinik, Abteilung Experimentelle Chirurgie und Immunologie, der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. H. Bockhorn durchgeführt.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. H. Bockhorn möchte ich mich für die Ermöglichung der Dissertation, für wertvolle Anregungen und für sein stetiges Interesse an meiner Weiterbildung auf dem Gebiet der Transplantationsimmunologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Bessler danke ich für die Einführung in das Gebiet der Immunologie und sein Interesse dieser Arbeit gegenüber.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. U. T. Hopt, der nicht nur durch seine stetige Kritik und Diskussionsbereitschaft entscheidend an der Gestaltung dieser Arbeit beteiligt war, sondern auch einer meiner wichtigsten wissenschaftlichen Lehrer war.

Frau M. Knauß, Herrn J. Mellert, Herrn V. Tumbass und Herrn U. Zangemeister danke ich für die Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die ausgezeichnete Versorgung der Versuchstiere danke ich Herrn W. Bramberger.

Allen übrigen Mitarbeitern in der Abteilung möchte ich für das gute Arbeitsklima danken.

Herrn Dr. R. Schubert gilt mein Dank vor allem für seine Rücksichtnahme und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ho 810/2) durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Material	6
2.1.1.	Versuchstiere	6
2.1.2.	Lösungen und Medien	6
2.2.	Methoden	8
2.2.1.	In vitro Methoden	8
2.2.1.1.	Isolierung von Lymphozyten aus der Milz	8
2.2.1.2.	Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut	8
2.2.1.3.	Zellseparation über Nylonwolle	9
2.2.1.4.	Mitomycin C-Behandlung	9
2.2.1.5.	Bestrahlung von lymphoiden Zellen	9
2.2.1.6.	Mitogene Stimulation	10
2.2.1.7.	Radioaktive Markierung von Lymphoblasten und Lymphozyten	10
2.2.1.8.	Gewinnung von spezifisch sensibilisierten Lymphozyten aus der gemischten Lymphozytenkultur	10
2.2.1.9.	Zellvermittelte Zytotoxizität	11
2.2.2.	In vivo Methoden	13
2.2.2.1.	Versuchstiere	13
2.2.2.2.	Schwamm-Matrix	13
2.2.2.3.	Implantationsmethode	13
2.2.2.4.	Explantation der Schwamm-Matrix-Allotransplantate	14
2.2.2.5.	Bestimmung der lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Implantate	15
2.2.2.6.	Bestimmung der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung im Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modell	17

2.2.3.	Isolierung von in vivo generierten SSLc	20
2.2.4.	Statistische Analyse	21
3.	Ergebnisse	23
3.1.	Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung durch SSLc nach Restimulation mit allogenen Zellen in Schwamm-Matrix-Implantate	23
3.1.1.	Modell	23
3.1.2.	Effekt von SSLc auf die Lymphozytenrekrutierung	23
3.1.3.	Zeitlicher Verlauf der Lymphozytenrekrutierung	25
3.1.4.	Korrelation zwischen der Zellzahl im Schwamm-Matrix-Transplantat und der Intensität der Lymphozytenrekrutierung	25
3.1.5.	Fähigkeit verschiedener allogener Zellpopulationen zur Restimulierung von zellrekrutierenden SSLc	28
3.1.6.	Einfluß des Sensibilisierungszeitraums auf die Zellrekrutierungskapazität der SSLc	31
3.1.7.	Effekt von in vivo generierten SSLc auf die lymphozytäre Infiltration	34
3.1.8.	Bestimmung der Parameter, die zur Lymphozyteninfiltration in Schwamm-Matrix-Implantate führen	34
3.2.	Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung durch allogene Zellen in Schwamm-Matrix-Implantate	38
3.2.1.	Modell	38
3.2.2.	Einfluß allogener Zellen auf die lymphozytäre Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate	38
3.2.3.	Zeitlicher Verlauf der Lymphozytenrekrutierung in Schwamm-Matrix-Allotransplantate durch allogene Zellen	39
3.2.4.	Zusammenhang zwischen der im Allotransplantat vorhandenen Zellzahl und der zellulären Infiltration dieser Transplantate	41

3.2.5.	Effekt verschiedener allogener Zellen auf die Lymphozytenrekrutierung	41
3.3.	Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung durch antiproliferativ behandelte allogene Zellen in Schwamm-Matrix-Implantate	45
3.3.1.	Erläuterung zum Modell	45
3.3.2.	Effekt einer Bestrahlung der allogenen Zellen	45
3.3.3.	Effekt einer Behandlung der allogenen Zellen mit Mitomycin C	47
3.4.	Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung an immunsupprimierten Mäusen	49
3.4.1.	Erläuterungen zur Immunsuppression	49
3.4.2.	Effekt von CyA auf die durch SSLc ausgelöste Lymphozytenrekrutierung	49
3.4.3.	Effekt von CyA auf die durch allogene Zellen ausgelöste zelluläre Infiltration	50
3.4.4.	Effekt von Dexamethason auf die durch allogene Zellen ausgelöste zelluläre Infiltration	52
3.4.5.	Wirkung von allogenen Zellen auf die lymphozytäre Infiltration in bestrahlten Mäusen	53
3.5.	Untersuchungen zum Zellrekrutierungseffekt im xenogenen System	57
3.5.1.	Erläuterungen zum xenogenen System	57
3.5.2.	Einfluß von xenogenen SSLc auf die lymphozytäre Infiltration	57
3.5.3.	Zeitlicher Verlauf der Lymphozytenrekrutierung in xenogene Schwamm-Matrix-Transplantate	59
3.5.4.	Wirkung verschiedener Zellen auf die lymphozytäre Infiltration in Schwamm-Matrix-Xenotransplantate	60
3.6.	Untersuchungen zur lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung	62
3.6.1.	Modell	62

3.6.2.	Veränderungen der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung in Abhängigkeit von der Zeit	62
3.6.3.	Abhängigkeit der lokalen Gefäßpermeabilität von der Anzahl an Zellen im Transplantat	64
4.	Diskussion	68
4.1.	Versuchsmodell	68
4.2.	Einfluß von SSLc auf die zelluläre Infiltration	70
4.3.	Einfluß von allogenen Zellen bei der Restimulation der SSLc	74
4.4.	Einfluß von allogenen Zellen auf die lymphozytäre Infiltration	76
4.5.	Mechanismen der erhöhten Zellrekrutierung	80
4.6.	Klinische Relevanz der Untersuchungen	82
4.7.	Regulation der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate	83
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	88

Abkürzungen

BALB	BALB/c J Han
CBA	CBA/CRBOM
ConA	Concanavalin A
cmp	counts per minute (Zählereignisse pro Minute)
C57	C57BL/6 J Han
CyA	Cyclosporin A
HLA	Human Leucocyte Antigen (Humane Leukozytenantigene)
I.E.	Internationale Einheit
i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
MLC	Mixed Lymphocyte Culture (Gemischte Lymphozytenkultur)
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Saline)
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	Züchtungsmedium (Roswell Park Memorial Institute)
s.c.	subcutan
SEM	Standard Error of Mean
SJL	SJL/NBOM
SSLc	Spezifisch sensibiliserte Lymphozyten

1. EINLEITUNG

Die grundlegende Eigenschaft des Immunsystems liegt in der Erkennung und Eliminierung von Fremdantigenen. Dies gilt sowohl für Proteine als auch für transplantiertes allogenes Gewebe. Grundsätzlich muß zwischen einer humoralen Immunreaktion, die von Antikörpern vermittelt wird, und einer zellulären Immunreaktion unterschieden werden. Bei der zellulären Immunreaktion, die vor allem bei der Abstoßung von transplantiertem Fremdgewebe von Bedeutung ist, spielen verschiedenartige Effektorzellen eine entscheidende Rolle. Diese vom Empfängerorganismus gebildeten Effektorzellen führen innerhalb des Allotransplantates durch direkten Zell-Zell-Kontakt zu einer zunehmenden Schädigung und damit zur Abstoßung des Allotransplantates. Die ersten Erkenntnisse über die zelluläre Immunreaktion gegenüber Allotransplantaten stammen von MEDAWAR (91), der schon vor 40 Jahren darauf hingewiesen hat, daß abgestoßene allogene Hauttransplantate massiv zellulär infiltriert sind. Die umfangreichen Erkenntnisse, die über die zelluläre Immunreaktion zwischenzeitlich gewonnen wurden, haben es ermöglicht, daß die Transplantation von allogenem Gewebe auch im klinischen Bereich routinemäßig durchgeführt wird. Trotzdem ist aber das Problem der akuten zellulären Abstoßungsreaktion immer noch nicht befriedigend gelöst. Ein relativ hoher Prozentsatz der transplantierten allogenen Organe geht dadurch frühzeitig verloren. Neben einer besseren Spender- und Empfängerauswahl und dem Einsatz neuer immunsuppressiver Medikamente kann daher letztlich nur durch ein besseres Verständnis der zellulären Grundlagen der Abstoßungsreaktion eine Verlängerung der Überlebenszeit von Allotransplantaten erreicht werden.
Prinzipiell läuft die zelluläre Immunantwort gegen Allotransplantate in drei Phasen ab. In der afferenten Phase durchströmen Lymphozyten, die zum größten Teil nicht sensibilisiert sind, das Transplantat und gelangen vorwiegend über den Lymphweg in lymphoides Gewebe (57). Dort entwickeln sie sich in der zentralen Phase zu aktivierten Lymphozyten, die sich durch Proliferation vermehren (35,46,64).

...

Diese spezifisch sensibilisierten Lymphozyten (SSLc) infiltrieren in der efferenten Phase das Transplantat (57).
MEDAWAR (91) konnte eine Akkumulation von Zellen im Transplantat bei der Abstoßungsreaktion finden. Später gelang es anderen Autoren (31,38,114,115) zu diesem Zeitpunkt SSLc im Transplantat nachzuweisen. Über die funktionellen Eigenschaften dieser SSLc herrschen kontroverse Ansichten. Einige Autoren (7,127,134) konnten zytotoxische Zellen nachweisen. Diese waren in der Lage, andere lymphoide Zellen zu lysieren, die das gleiche Antigen trugen, das zu ihrer Sensibilisierung beigetragen hatte. Dahingegen konnte von WILLEBRAND (145) demonstrieren, daß Parenchymzellen von diesen zytotoxischen Zellen nicht abgetötet werden. LOVELAND (85) favorisiert dementsprechend die Hypothese, daß nicht Lyt-2^+ zytotoxische T-Zellen, sondern Lyt-1^+ T-Zellen das Hauptzerstörungspotential in einem Allotransplantat bilden. Der Lyt-1^+ Phänotyp kann sowohl auf T-Helferzellen als auch auf T-Zellen vom Typ der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion gefunden werden. Für Zellen dieses Phänotyps ist in vitro eine starke Lymphokinproduktion nachgewiesen worden (42,76,106). Derartige Lymphokine sind auch in vivo für die Auslösung einer Reaktion vom verzögerten Überempfindlichkeitstyp verantwortlich (86,130). Dabei ist vor allem ein stimulierender Effekt auf die lokale Zellinfiltration von Bedeutung.
Damit liegt die Wirkung der SSLc wohl zum einen in ihrer Fähigkeit, spezifische Targetzellen zu lysieren. Andererseits sind sie in der Lage, über den unspezifischen Mechanismus der Sekretion von chemotaktischen Lymphokinen andere Effektorzellen zum Transplantat zu rekrutieren. Beide Mechanismen setzen die Anwesenheit von SSLc im Transplantat voraus. Wie schon oben erwähnt infiltrieren SSLc während der efferenten Phase das Transplantat. HOPT (67) konnte demonstrieren, daß während der Abstoßungsperiode über einen immunologisch spezifischen Mechanismus SSLc und nicht-sensibilisierte Lymphozyten zum Transplantat rekrutiert werden. SSLc sind also in der Lage, eine unspezifische Akkumulation von Zellen auszulösen (4,74,92). Dafür sind Lymphokine verantwortlich gemacht worden (36).

...

Alle diese Erkenntnisse geben aber bisher nur wenig Aufschluß über die Regulation der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate. Deswegen sollten in den nachfolgenden Untersuchungen folgende Fragenkomplexe geklärt werden:

1. Welche Funktion üben die SSLc auf die zelluläre Infiltration bei einer Abstoßungsreaktion aus?

   An Modellen der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion konnte gezeigt werden, daß eine spezifische Interaktion zwischen SSLc und dem spezifischen Antigen stattfindet (74,88). Daher sollte geklärt werden, ob auch in einem Allotransplantat eine derartige spezifische Interaktion Voraussetzung für die lymphozytäre Infiltration ist. Dazu sollten sowohl der zeitliche Verlauf der Infiltration als auch die Korrelation zwischen der Anzahl an Zellen im Transplantat und der Infiltration untersucht werden. Von Interesse war weiterhin, ob ein Zusammenhang zwischen der zytotoxischen Aktivität der SSLc und ihrer Zellrekrutierungskapazität besteht, welche allogenen lymphoiden Zellen zur Restimulation dieser SSLc fähig sind und ob SSLc nach Restimulation mit den spezifischen allogenen Zellen die lokale Gefäßpermeabilität und Durchblutung und damit den Zelleinstrom im Allotransplantat verändern können.

2. Über welchen Mechanismus wird die lymphozytäre Infiltration in Allotransplantate in der Frühphase unmittelbar nach Transplantation reguliert?

   Wenig Aufmerksamkeit ist bisher der Frage gewidmet worden, ob die anfängliche Infiltration in der afferenten Phase kurz nach der Transplantation auf einem Zufallsereignis beruht. Einige Autoren (98,103) haben darauf hingewiesen, daß den Passenger-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Abstoßungsreaktion zukommt. Welche Funktion sie dabei ausüben, ist aber bisher noch ungeklärt. Daher sollte untersucht werden, ob Allotransplantate

...

in unbehandelten und immunsupprimierten Tieren in den ersten Tagen stärker infiltriert werden als Isotransplantate und welchen zeitlichen Verlauf diese lymphozytäre Infiltration hat. Zudem sollte die Rekrutierungskapazität verschiedener lymphoider allogener Zellen und die Korrelation zwischen Anzahl der allogenen Zellen im Transplantat und der vermehrten Lymphozytenrekrutierung bestimmt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Lymphozytenrekrutierung in Allotransplantate durch antiproliferative Behandlung der allogenen Zellen unterbunden werden kann.

3. Inwieweit kann die Zellrekrutierungskapazität von Lymphozytenpopulationen durch immunsuppressive Medikamente beeinflußt werden?

   Die Wirkung der im klinischen Bereich verwandten immunsuppressiven Medikamente auf die lymphozytäre Infiltration in Allotransplantate ist bisher nur wenig untersucht worden. Aus diesem Grund sollte geprüft werden, ob der bekannte immunsuppressive Effekt von Cyclosporin A und Dexamethason zumindest zum Teil auf eine Suppression der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate zurückgeführt werden kann.

4. Sind die im Tierexperiment gefundenen Ergebnisse auf die Situation beim Menschen übertragbar?

   Derzeit besteht keine Möglichkeit, die lymphozytäre Infiltration in Allotransplantate beim Menschen experimentell zu untersuchen. Daher sollte geklärt werden, ob die in diesem Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modell gefundenen Ergebnisse auch Aufschluß über die Regulation der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate beim Menschen geben. Dabei war vor allem von Interesse, ob die Zellrekrutierungskapazität von humanen Lymphozytenpopulationen auch im xenogenen Mäusesystem nachgewiesen und dabei funktionell charakterisiert werden kann.

...

Die hier aufgeführten Problemkreise wurden anhand des von HOPT (69) entwickelten zellfreien Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modells untersucht. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, beliebige Zellarten auf ihre Beteiligung bei der zellulären Immunreaktion zu untersuchen. Entscheidend ist dabei ferner, daß sowohl die Zellzahl als auch der Zeitraum der Reaktion genau definiert sind.

...

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

BALB/c J Han (BALB, H-2^d)	Zentralanstalt für Versuchstiere
C57BL/6 J Han (C57, H-2^b)	Hannover, BRD
SJL/NBOM (SJL, H-2^s)	GI. Bomholtgård, Ltd. DK
CBA/CRBOM (CBA, H-2^k)	C. W. Friis, 8688 Ry, Denmark

2.1.2. Lösungen und Medien

Medium A: RPMI 1640 (Gibco)
2×10^{-3}M L-Glutamin (Seromed)
100 µg/ml Gentamycin (Serva)

Medium B: Medium A
1×10^{-3}M Natrium-Pyruvat (Merck)
1×10^{-4}M nicht essentielle Aminosäuren (Gibco)
5×10^{-5}M 2-Mercaptoäthanol (Merck)
10 % Fötales Kälberserum (Gibco)

Medium C: Medium A
5 % Fötales Kälberserum

Gey's Solution: Lösung A - 35 g NH_4Cl (Merck)
1,85 g KCl (Merck)
1,5 g $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ (Merck)
0,119 g KH_2PO_4 (Merck)
5 g Glucose (Merck)/l H_2O

...

Lösung B - 0,42 g $MgCl_2$ x $6H_2O$ (Merck)
0,14 g $MgSO_4$ x $7H_2O$ (Merck)/100 ml H_2O

Lösung C - 2,25 g $NaHCO_3$ (Merck)/100 ml

Gebrauchslösung - 2 ml Lösung A
0,5 ml Lösung B
0,5 ml Lösung C
7 ml H_2O

Dexamethasonlösung:

8,69 mg Dexamethasonacetat (Sigma, MG 434,5) wurden in 0,5 ml Äthanol p.A. (Roth) gelöst und anschließend 1:40 mit RPMI 1640 verdünnt. Diese Stammlösung wurde vor der Verwendung im Versuchsansatz 1:5 mit den entsprechenden Zellsuspensionen verdünnt.

Cyclosporin A-Lösung:

Cyclosporin A (CyA) wurde in Olivenöl bei einer Temperatur von 45°C gelöst. Den Mäusen wurden unterschiedliche Dosen an CyA in 0,1 ml Olivenöl appliziert.

...

2.2. Methoden

2.2.1. In vitro Methoden

Alle in vitro Methoden wurden unter aseptischen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt.
Wenn im folgenden nicht gesondert aufgeführt, erfolgte das Waschen in Medium A durch Pellettierung der Lymphozyten bei 800 x g bzw. der Lymphoblasten bei 200 x g in 10 Minuten und Verwerfung des Überstandes.
Alle Seren, die verwandt worden sind, wurden 30 Minuten bei 56°C hitzeaktiviert.

2.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus der Milz

Die Milzen der jeweiligen Versuchstiere wurden nach Exzision in Medium A aufgenommen und durch ein Stahlsieb (Schnitzer) mit der Porengröße 200 µm gedrückt.
Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit waren im Überstand die isolierten Zellen, während sich größere Zellaggregate und Gewebsstücke abgesetzt hatten. Der Überstand wurde 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das Zellpellet in Geys' Solution aufgenommen und 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Milzzellen wurden anschließend dreimal in Medium A gewaschen.

2.2.1.2 Isolierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Peripheres Blut wurde mit 50 I.E./ml Liquemin (Hoffmann-La Roche) versetzt. Das heparinisierte Blut wurde mit dem gleichen Volumen Medium A verdünnt und über Ficoll-Paque (Pharmacia) mit der Dichte 1,077 g/cm³ geschichtet. Nach 25 Minuten Zentrifugation bei 800 x g

...

wurde der Lymphozytenring abgehoben und zweimal in Medium A gewaschen.

2.2.1.3. Zellseparation über Nylonwolle

Das Verfahren von JULIUS (73) wurde modifiziert zur Auftrennung von Milzzellen angewendet. Für Jeweils 100 x 10^6 Zellen wurden 0,6 g Nylonwolle (Fenwal) locker in eine Plastikspritze (Pharma Plast) gepackt und sterilisiert. Vor der Verwendung wurde die Nylonwolle mehrmals mit Medium A gewaschen, zuletzt mit Medium C durchtränkt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension von 100 x 10^6 Zellen wurde in 3 ml Medium C von 37°C aufgenommen und auf die Nylonwolle aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 45 Minuten bei 37°C.
Die nicht-adhärenten Zellen wurden mit 20 ml Medium C ausgewaschen, die adhärenten Zellen wurden mit 100 ml Medium C durch mechanisches Pressen der Nylonwolle abgelöst.
Die beiden Fraktionen wurden anschließend zweimal in Medium A gewaschen.

2.2.1.4. Mitomycin C-Behandlung

Zur Mitomycin C-Behandlung wurden die Zellen auf 10 x 10^6/ml Medium A eingestellt. Zu dieser Zellsuspension wurden 50 µg/ml Mitomycin C (Medac) gegeben. Anschließend wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal in Medium A gewaschen.

2.2.1.5. Bestrahlung von lymphoiden Zellen

Die Bestrahlung von Zellen erfolgte in einer Konzentration von 5 x 10^6 Zellen/ml Medium A mit einer sublethalen Dosis von 20 Gy (2000 rad, Mevatron, Siemens). Die Zellen wurden anschließend

...

pellettiert und auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

2.2.1.6. Mitogene Stimulation

Die mitogene Stimulation muriner Milzzellen erfolgte mit 2 µg/ml Concanavalin A (ConA, Serva) oder 30 µg/ml Lipopolysaccharid W von E. coli 055:B5 (LPS, Difco).
Dazu wurden 100 x 10^6 Milzzellen in 50 ml Medium B, das mit der entsprechenden Menge an Mitogen versetzt war, in Kulturflaschen (Nunc) für 2 Tage (37°C, 5 % CO_2 und H_2O-gesättigter Atmosphäre) inkubiert.

Humane Lymphozyten wurden auf eine Zellzahl von 1 x 10^6 Lymphozyten/ml Medium A mit 10 % autologem Serum und 5 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA, Wellcome) eingestellt. Die Lymphozytenkultur wurde 3 Tage unter gleichen Bedingungen inkubiert.
Anschließend wurden die Zellen geerntet und zweimal gewaschen.

2.2.1.7. Radioaktive Markierung von Lymphoblasten und Lymphozyten

Zur radioaktiven Markierung von Zellen wurde ^{51}Cr (Natriumchromat, New England Nuclear) verwandt. Lymphoblasten und Lymphozyten wurden unter gleichen Bedingungen markiert.
Bis zu 200 x 10^6 Zellen wurden in 1 ml Medium B resuspendiert und mit 250 µCi ^{51}Cr für 60 - 90 Minuten bei 37°C inkubiert.
Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen.

2.2.1.8. Gewinnung von spezifisch sensibilisierten Lymphozyten aus der gemischten Lymphozytenkultur

Die gemischte Lymphozytenkultur (MLC) wurde angewandt, um spezifisch

...

sensibilisierte Lymphozyten (SSLc) zu generieren. In allen Versuchsansätzen wurde eine Ein-Weg-MLC eingesetzt, wobei eine Lymphozytenpopulation ("Stimulator") zur spezifischen Stimulation einer anderen Lymphozytenpopulation ("Responder") diente. Die Stimulatorzellen wurden durch Mitomycin C an der Proliferation gehemmt.
In allen Kulturen mit murinen Milzzellen wurden die Responderzellen aus BALB-Mäusen gewonnen. Als Stimulatoren dienten entweder C57- oder SJL-Milzzellen.
In Kulturflaschen wurden 37,5 x 10^6 Responderzellen mit 75 x 10^6 Stimulatorzellen in 30 ml Medium B für 4 Tage bei 37°C in 5 % CO_2 und einer H_2O-gesättigten Atmosphäre inkubiert.
Bei Verwendung von Humanzellen wurden 10 x 10^6 Responderzellen durch 10 x 10^6 Stimulatorzellen in 20 ml Medium A mit 10 % autologem Serum stimuliert. Die Inkubation wurde unter obigen Bedingungen 7 Tage durchgeführt.
Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die SSLc zweimal gewaschen und anschließend auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.2.1.9. Zellvermittelte Zytotoxizität

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der SSLc gegenüber Mitogen-stimulierten Blasten wurde die Methode von BRUNNER (23) modifiziert.
5 x 10^4 ^{51}Cr-markierte Lymphoblasten wurden als Targetzellen zusammen mit 2 x 10^5, 4 x 10^5 bzw. 8 x 10^5 SSLc als Effektorzellen in einem Endvolumen von 200 µl Medium B in U-förmigen Mikrotiterplatten (Flow Laboratories) suspendiert. Es wurden jeweils 4fach-Bestimmungen durchgeführt. Die zytotoxische Aktivität wurde sowohl gegenüber spezifischen als auch gegenüber unspezifischen Targetzellen getestet.
Zur Bestimmung der spontanen ^{51}Cr-Freisetzung von Targetzellen wurden diese ohne SSLc im gleichen Endvolumen suspendiert. Die Platten wurden 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und anschließend für 4 Stunden bei 37°C inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die Platten 5 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und jeweils 100 µl Überstand aus jedem Testloch entnommen.

...

Aus den Ansätzen, die lediglich Targetzellen enthielten, wurde das Zellpellet im verbleibenden Endvolumen resuspendiert und entnommen, um den maximalen Einbau an ^{51}Cr in die Targetzellen zu bestimmen. Alle Proben wurden im Gamma-Counter (Strahlentechnik) gezählt. Die spontane ^{51}Cr-Freisetzung betrug 10 % - 25 % des gesamten ^{51}Cr-Einbaus, der sich aus der spontanen ^{51}Cr-Freisetzung und den Werten vom resuspendierten Zellpellet zusammensetzt.
Die zytotoxische Aktivität stellt den prozentualen Anteil an lysierten Targetzellen dar und wurde nach folgender Formel (bezogen auf gleiche Volumina) berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \frac{\text{Test cpm - spontane cpm}}{\text{cpm des maximalen Einbaus - spontane cpm}} \times 100$$

...

2.2.2. In vivo Methoden

2.2.2.1. Versuchstiere

6 - 10 Wochen alte weibliche Mäuse wurden als Versuchstiere verwandt. Die Haltung erfolgte in Plastikkäfigen mit Trockenfutter (Altromin Standard Diät) und Leitungswasser ad lib.

2.2.2.2. Schwamm-Matrix

Als Schwamm-Matrix wurden 17 x 15 x 10 mm große Polyurethanschwämme (Groll Schaumstoffcenter) verwandt.
Diese Schwämme wurden behandelt nach einer modifizierten Methode von LEIGHTON (79).
Die Schwämme wurden dreimal in destilliertem H_2O gewaschen, zweimal für 30 Minuten gekocht, je 30 Minuten in Aceton und 99,9 %igem Alkohol eingeweicht, erneut zweimal in destilliertem H_2O gewaschen und zweimal für 30 Minuten gekocht.
Anschließend wurden die Schwämme ausgedrückt und in Glaspetrischalen autoklaviert.
Kurz vor der Implantation in die Versuchstiere wurden die Schwämme in Medium A aufgenommen.

2.2.2.3. Implantationsmethode

In allen Versuchen waren die Transplantatempfänger 6 - 7 Wochen alte BALB-Mäuse.
Nach einer s.c. Injektion von 1 ml Medium A erfolgte die Implantation unter Äthernarkose.
Die Mäuse wurden dorso-caudal rasiert. Durch zwei kleine Einschnitte an der rechten und linken Schwanzwurzel war es möglich, nach stumpfer Präparation an den dorso-lateralen Thoraxwänden zwei

...

subcutane Taschen anzulegen. In diese Taschen wurde je eine Schwamm-Matrix eingeschoben (Abb. 1). Anschließend wurden die Schnittstellen mit Ethibond 5-0 (Ethicon) vernäht.

ABB. 1: Seitenansicht einer BALB-Maus während der Schwamm-Matrix-Implantation.
Von der Schnittstelle (kleiner Pfeil) wurde die Schwamm-Matrix an die laterale Thoraxwand (großer Pfeil) geschoben.

2.2.2.4. EXPLANTATION DER SCHWAMM-MATRIX-ALLOTRANSPLANTATE

Die Explantation der Schwamm-Matrix erfolgte durch Abtrennen der Matrix vom umgebenden Bindegewebe. Alle Proben wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen und anschließend auf Blutagarplatten

...

(Heipha) abgeimpft. Die Agarplatten wurden danach bei 37°C inkubiert und kontaminierte Proben aus der Versuchsgruppe eliminiert.

2.2.2.5. Bestimmung der lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Implantate

Die lymphozytäre Infiltration wurde bei allen Versuchen 17 - 18 Tage nach der Implantation bestimmt, da die Schwämme zu diesem Zeitpunkt gut vaskularisiert sind (Abb. 2).

Abb. 2: Aufsicht auf eine BALB-Maus während der Explantation der Schwamm-Matrix, rechts und links im Bild die vaskularisierten Schwamm-Matrix-Implantate.

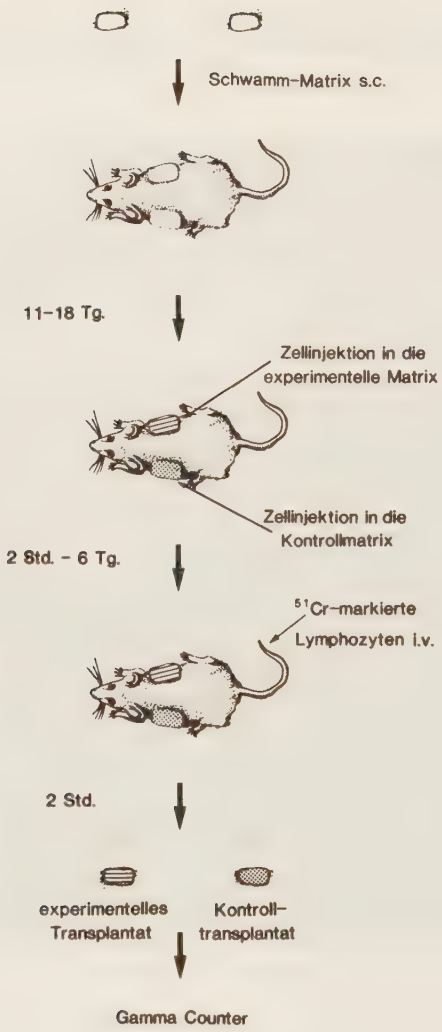

ABB. 3: Modell zur Bestimmung der lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate.

...

Zwei prinzipiell verschiedene Modelle wurden angewandt. Im ersten Modell wurden syngene oder xenogene SSLc zusammen mit spezifischen Zellen, d. h. Zellen, die das sensibilisierende Alloantigen tragen, in das experimentelle Schwamm-Matrix-Implantat gespritzt. In den Kontrollschwamm wurden dagegen SSLc und unspezifische Zellen injiziert.
Im zweiten Modell wurden den Mäusen in die experimentellen Schwämme allogene und in die Kontrollschwämme syngene nicht-sensibilisierte Zellen eingespritzt. Die untersuchten Zellarten sind bei den Versuchsansätzen jeweils im einzelnen erläutert.
Die Zellinjektion erfolgte in beiden Modellen zu verschiedenen Zeiten vor Versuchsende und jeweils in 0,3 ml RPMI 1640.
Zur Bestimmung der lymphozytären Infiltration wurden den Versuchstieren jeweils zwei Stunden vor Versuchsende 15 - 30 x 10^6 ^{51}Cr-markierte (200.000 - 800.000 cpm) syngene Lymphozyten/0,3 ml RPMI 1640 i.v. injiziert. Die nach Versuchsende exzidierten Schwamm-Matrix-Transplantate wurden im Gamma-Counter (Kanal 250 - 400 keV) gezählt (Abb. 3). Die zellgebundene Aktivität wurde für die einzelnen Proben als Prozentsatz der insgesamt injizierten Aktivität errechnet.

2.2.2.6. Bestimmung der lokalen Gefässpermeabilität und Durchblutung im Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modell

Die lokale Gefäßpermeabilität und Durchblutung wurde, wie unter 2.2.2.5. für das erste Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modell beschrieben, bestimmt.
Dazu wurde eine ^{125}J-Humanalbuminlösung (Amersham Buchler) mit RPMI 1640 verdünnt (ca. 10^6cpm) und 2 Stunden vor Versuchsende den Versuchstieren i.v. appliziert. Eine in PBS (Seromed) verdünnte Lösung von $^{86}RbCl$ (NEN, 100.000 - 200.000 cpm) wurde 2 Stunden später i.v. injiziert. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte weitere 45 Sekunden später durch i.v.-Injektion einer gesättigten KCl-Lösung (Merck) (Abb. 4).

...

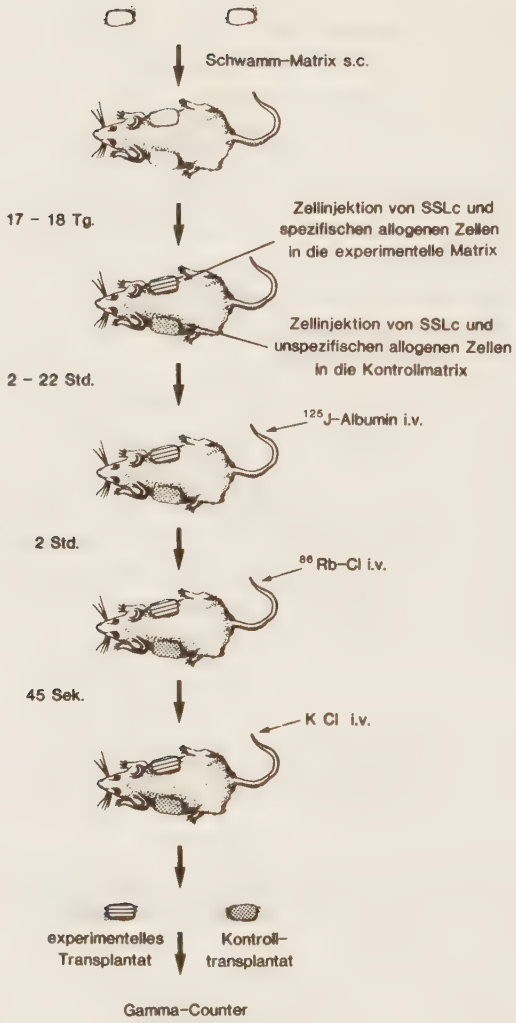

ABB. 4: Modell zur Bestimmung der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung in Schwamm-Matrix-Allotransplantaten.

...

Die Radioaktivität der verschiedenen Schwamm-Matrix-Transplantate wurde im Gamma-Counter gezählt und wie bei der Bestimmung der lymphozytären Infiltration als Prozentsatz der Gesamtaktivität, die injiziert worden war, angegeben. Die Aktivität von ^{125}J wurde in einem Kanal von 10 - 30 keV, die von ^{86}Rb zwischen 450 und 2000 keV bestimmt.
Die Einstrahlung von ^{86}Rb in den ^{125}J-Kanal wurde dabei rechnerisch berücksichtigt.

...

2.2.3. Isolierung von in vivo generierten SSLc

Um anti-C57-SSLc in vivo zu generieren, wurden je 30 x 10^6 C57-Milzzellen in beide Schwamm-Matrix-Implantate injiziert, die BALB-Mäusen 10 Tage vorher implantiert worden waren. 9 Tage später wurden diese Transplantate exzidiert und in Medium A in Petrischalen (Falcon) aufgenommen. Die Isolierung der enthaltenen Zellen erfolgte durch mechanisches Ausdrücken der Schwamm-Matrix unter zweimaligem Mediumwechsel. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g für 10 Minuten pellettiert. Die Erythrozyten wurden durch Gey's Solution lysiert und die verbliebenen Zellen noch zweimal in Medium A gewaschen.

2.2.4. Statistische Analyse

Bei der Bestimmung der lymphozytären Infiltration bzw. der Gefäßpermeabilität und Durchblutung bestand jede Versuchsgruppe aus 6 - 10 Versuchstieren. Wie unter 2.2.2.5. und 2.2.2.6. angegeben, wurde für jede einzelne Probe die prozentuale Aktivität ermittelt. Für jede Versuchsgruppe wurde anschließend das arithmetische Mittel für das experimentelle Transplantat und das Kontrolltransplantat errechnet und die Werte als $\bar{X}_a \pm SEM$ angegeben.
Um die Unterschiede zwischen dem experimentellen Transplantat und dem Kontrolltransplantat beurteilen zu können, wurde für jedes Versuchstier ein Index nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Index} = \frac{\text{cpm im experimentellen Transplantat}}{\text{cpm im Kontrolltransplantat}}$$

Für jede Versuchsgruppe wurde aus den Indizes das geometrische Mittel und das 95 % Konfidenzintervall errechnet. Die Angaben erfolgen als $\bar{X}_g$ obere Grenze / untere Grenze

Die Berechnung erfolgte nach

$$\bar{X}_g = 10^{\bar{X}_{log} \pm t_{n-1,\ 0.975} \cdot s_{log} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}}$$

wobei

...

$\overline{X}_g$	das geometrische Mittel
$\overline{X}_{log}$	das arithmetische Mittel der Logarithmen der Einzelindizes
s_{log}	die Standardabweichung der Logarithmen der Einzelindizes
n	die Zahl der Versuchstiere pro Gruppe und
$t_{n-1,0.975}$	den t-Wert bei einer bestimmten Versuchstierzahl und bei 95 % Vertrauensbereich

bedeuten.

Ein Index von 1 bedeutet dabei, daß kein Unterschied zwischen experimentellem Transplantat und Kontrolltransplantat gefunden wurde. Werte, die über oder unter 1 liegen, weisen hingegen auf eine Erhöhung oder Supprimierung des jeweils untersuchten Parameters im experimentellen Transplantat hin.
Die Signifikanz derartiger Erhöhungen oder Supprimierungen wurde anhand des Wilcoxon-Rang-Summentestes für abhängige Stichproben ermittelt, wobei eine Signifikanzschwelle von $p > 0,05$ angenommen wurde. Die Indizes für die lymphozytäre Infiltration, Gefäßpermeabilität und Durchblutung wurden als Rekrutierungs-, Permeabilitäts- und Durchblutungsindex bezeichnet.

...

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung durch SSLc nach Restimulation mit allogenen Zellen in Schwamm-Matrix-Implantate

3.1.1. Modell

Zu Versuchsbeginn, 17 - 18 Tage nach Implantation der Schwamm-Matrix, wurden SSLc zusammen mit spezifischen allogenen Zellen in den experimentellen Schwamm lokal injiziert, während der Kontrollschwamm SSLc und unspezifische allogene Zellen erhielt. Die Lymphozytenrekrutierung zu den Allotransplantaten wurde durch Verwendung von ^{51}Cr-markierten Lymphozyten bestimmt, die 2 Stunden vor Versuchsende i.v. injiziert wurden. Der Zeitraum zwischen Versuchsbeginn und -ende ist jeweils bei den Versuchen im einzelnen aufgeführt.

3.1.2. Effekt von SSLc auf die Lymphozytenrekrutierung

Im folgenden Versuchsabschnitt sollte geklärt werden, ob eine spezifische Interaktion zwischen SSLc und allogenen Zellen stattfindet. Dazu wurden 5 x 10^6 anti-C57-SSLc zusammen mit 10 x 10^6 ConA-stimulierten C57- bzw. SJL-Blasten lokal in die Schwamm-Matrix injiziert. Die Infiltration der ^{51}Cr-markierten Lymphozyten in die Allotransplantate wurde nach 20 Stunden bestimmt. In das spezifische Transplantat, das die C57-Blasten enthielt, wanderten 35 % mehr Lymphozyten als in das unspezifische SJL-Transplantat. Die Aktivität im C57-Transplantat betrug 1,32 % der injizierten Gesamtaktivität. Das unspezifische mit SJL-Blasten injizierte Transplantat enthielt dagegen nur 0,94 % der Gesamtaktivität.
Ein analoger Effekt trat nach Verwendung von anti-SJL-SSLc und allo-

...

genen Zellen auf. Hierbei wanderten 27 % mehr Lymphozyten in den Schwamm, der die SJL-Blasten enthielt (Abb. 5).
Damit konnte in beiden Versuchsansätzen eine spezifische Interaktion zwischen SSLc und den allogenen Zellen nachgewiesen werden, die das gleiche Alloantigen trugen, das zur Sensibilisierung der SSLc verwandt worden war.

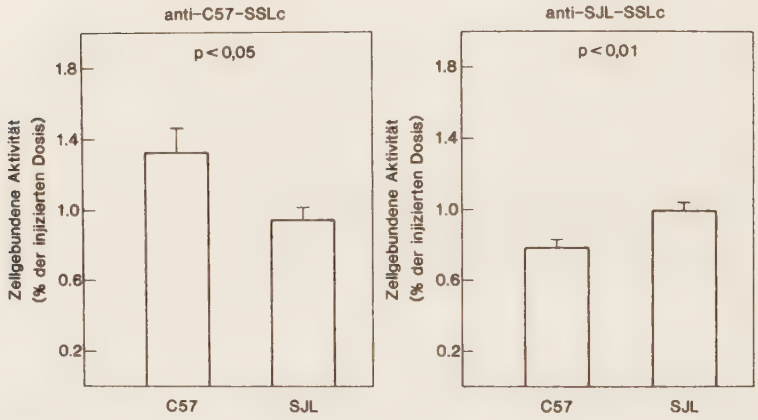

ABB. 5: Zellgebundene Aktivität in Schwamm-Matrix-Allotransplantaten nach lokaler Injektion von SSLc und spezifischen bzw. unspezifischen allogenen Lymphoblasten.

...

3.1.3. Zeitlicher Verlauf der Lymphozytenrekrutierung

Um den zeitlichen Verlauf des Lymphozytenrekrutierungseffektes zu bestimmen, wurde die zelluläre Infiltration zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Injektion in die Schwamm-Matrix gemessen. Dazu wurden die Schwamm-Matrix-Implantate je mit 5 x 10^6 anti-C57-SSLc und 10 x 10^6 C57- bzw. SJL-ConA-Blasten lokal injiziert. Schon nach 4 Stunden konnte eine signifikante Erhöhung des Rekrutierungsindex nachgewiesen werden. Das spezifische Allotransplantat wurde um 19 % stärker infiltiert als das unspezifische. Das Maximum der Lymphozytenrekrutierung war 12 Stunden nach lokaler Zellinjektion nachweisbar. Der Rekrutierungsindex betrug 2,29.
Zu diesem Zeitpunkt war das spezifische Allotransplantat mit 1,26 % der Gesamtaktivität am stärksten infiltriert. Nach einem noch größeren Zeitraum zwischen lokaler Zellinjektion und Versuchsende fiel der Index ab und betrug nach 24 Stunden nur noch 0,93. Die Aktivität im spezifischen Transplantat sank wesentlich langsamer als der Rekrutierungsindex. Die Aktivität im unspezifischen Transplantat hingegen stieg kontinuierlich an (Tab. 1).

3.1.4. Korrelation zwischen der Zellzahl im Schwamm-Matrix-Transplantat und der Intensität der Lymphozytenrekrutierung

In diesem Untersuchungsabschnitt sollte geklärt werden, inwieweit die Zellzahl im Transplantat Einfluß auf die lymphozytäre Infiltration hat.
Deshalb wurden verschiedene Mengen an anti-C57-SSLc zusammen mit 10 x 10^6 C57- bzw. SJL-ConA-Blasten in die Schwamm-Matrix-Implantate injiziert. Die Lymphozytenrekrutierung wurde nach 8 Stunden bestimmt. Bereits für 0,75 x 10^6 SSLc konnte eine signifikante Lymphozytenrekrutierung nachgewiesen werden. Die lymphozytäre Infiltration stieg mit zunehmender Anzahl an SSLc im spezifischen Transplantat von 0,45 % auf 0,63 %.

...

ZEIT (STD)	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGSINDEX	P
	C57	SJL		
4	0.34 ± 0.02	0.28 ± 0.02	1.19 $\frac{1.40}{1.01}$	< 0.05
8	0.83 ± 0.02	0.38 ± 0.02	2.21 $\frac{2.60}{1.88}$	< 0.01
12	1.26 ± 0.11	0.55 ± 0.05	2.29 $\frac{2.64}{1.99}$	< 0.025
18	1.24 ± 0.09	0.74 ± 0.16	1.81 $\frac{2.53}{1.29}$	< 0.025
24	0.92 ± 0.05	0.99 ± 0.07	0.93 $\frac{1.04}{0.83}$	N.S. *

*N.S. = NICHT SIGNIFIKANT

TAB. 1: Veränderungen der lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate nach lokaler Injektion von anti-C57-SSLc in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Aktivität im unspezifischen Transplantat blieb dagegen unverändert. Der Rekrutierungsindex stieg von 1,28 auf 2,08 (Abb. 6). Eine ähnliche Erhöhung des Rekrutierungsindex konnte für 5 x 10^6 anti-C57-SSLc und eine zunehmende Anzahl an C57- bzw. SJL-Blasten demonstriert werden. Der Rekrutierungsindex stieg von 1,20 bei Injektion von 1,25 x 10^6 Blasten auf 1,94 bei Injektion von 10 x 10^6 Blasten (Abb. 7). Somit konnte für SSLc und allogene Zellen eine enge Korrelation zwischen Zellzahl im Transplantat und dem Ausmaß der Lymphozytenrekrutierung nachgewiesen werden.

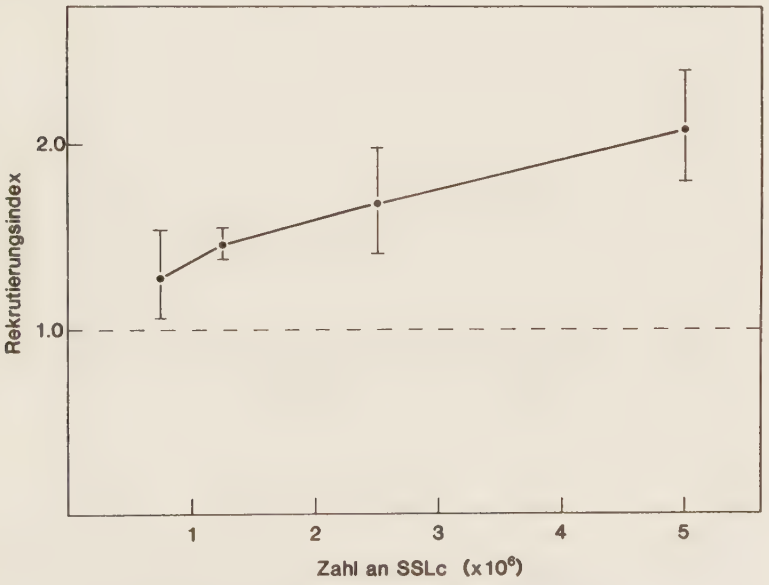

ABB. 6: Zellrekrutierung zu C57-Allotransplantaten in Abhängigkeit von der Anzahl an anti-C57-SSLc im Transplantat.

...

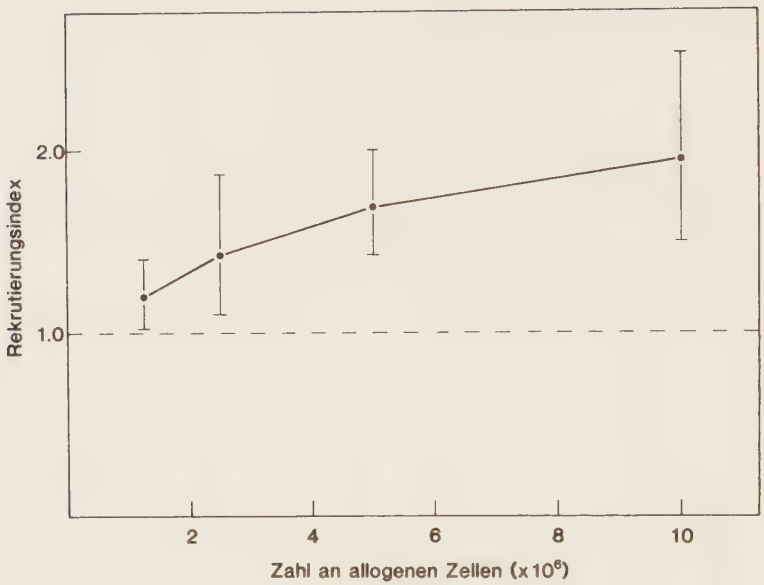

ABB. 7: Zellrekrutierung durch anti-C57-SSLc zu einem C57-Allotransplantat in Abhängigkeit von der Anzahl an C57-Lymphoblasten im Transplantat.

3.1.5. FÄHIGKEIT VERSCHIEDENER ALLOGENER ZELLPOPULATIONEN ZUR RESTIMULIERUNG VON ZELLREKRUTIERENDEN SSLc

Da die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen unterschiedliche Antigene tragen, denen jeweils eine andere Rolle bei der Stimulierung einer allogenen Immunantwort zukommt, sollte im folgenden untersucht werden, inwieweit verschiedene Lymphozytensubpopulationen

...

ANZAHL AN ANTI-C57-SSLc ($x10^6$)	ANZAHL UND ART DER ALLOGENEN ZELLEN ($x10^6$)	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGS-INDEX	P
		C57	SJL		
5	20 T-LYMPHOBLASTEN	0.66 ± 0.09	0.45 ± 0.03	$1.41\,^{1.74}_{1.14}$	< 0.01
5	10 B-LYMPHOBLASTEN	0.73 ± 0.03	0.38 ± 0.05	$1.99\,^{2.69}_{1.47}$	< 0.005
4	10 MILZZELLEN	0.84 ± 0.08	0.41 ± 0.06	$1.91\,^{2.55}_{1.43}$	< 0.01
4	10 T-LYMPHOZYTEN	0.63 ± 0.04	0.42 ± 0.02	$1.47\,^{1.61}_{1.35}$	< 0.01
4	10 B-LYMPHOZYTEN	0.95 ± 0.09	0.55 ± 0.02	$1.70\,^{2.17}_{1.33}$	< 0.01

TAB. 2: Zelluläre Infiltration in verschiedene Schwamm-Matrix-Allotransplantate nach lokaler Injektion von anti-C57-SSLc.

einen Einfluß auf die Restimulierung der zellrekrutierenden SSLc haben.

In zwei voneinander unabhängigen Versuchen wurde die Lymphozytenrekrutierung zu Schwamm-Matrix-Implantaten bestimmt, die mit SSLc und verschiedenen Lymphozytensubpopulationen injiziert worden waren.

Im ersten Versuch wurden SSLc mit ConA-induzierten T-Lymphoblasten bzw. mit LPS-induzierten B-Lymphoblasten restimuliert. Dazu wurden 5×10^6 anti-C57-SSLc zusammen mit 20×10^6 T-Lymphoblasten bzw. mit 10×10^6 B-Lymphoblasten lokal in die Schwamm-Matrix injiziert. Im zweiten Versuch wurden 4×10^6 anti-C57-SSLc mit 10×10^6 Milzzellen bzw. mit über Nylonwollseparation angereicherten T- und B-Lymphozyten restimuliert. Es wurde jeweils die Rekrutierung zum spezifischen C57- bzw. zum unspezifischen SJL-Transplantat gemessen. Die lymphozytäre Infiltration wurde in beiden Versuchen 8 Stunden nach Zellinjektion in die Schwämme bestimmt. Der Rekrutierungsindex lag in den einzelnen Versuchsansätzen zwischen 1,41 und 1,99. In allen Fällen fand demnach eine signifikant erhöhte Migration der Lymphozyten zu dem spezifischen Allotransplantat statt (Tab. 2). SSLc sind demnach in der Lage, sowohl bei Interaktion mit T-Lymphozyten oder T-Lymphoblasten als auch bei Restimulation mit B-Lymphozyten oder B-Lymphoblasten eine signifikante Lymphozytenrekrutierung auszulösen.

3.1.6. Einfluss des Sensibilisierungszeitraums auf die Zellrekrutierungskapazität der SSLc

In den vorangegangenen Versuchen wurden die SSLc zum Zeitpunkt der größten spezifischen Zytotoxizität, d. h. am 4. Tag nach Beginn der Sensibilisierungsphase, aus der in vitro Kultur gewonnen. In dem folgenden Experiment wurden SSLc, die zu verschiedenen Zeiten nach Kulturbeginn geerntet wurden, auf ihre Rekrutierungskapazität getestet. Dazu wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt.
In dem einen Versuchsansatz wurden 5 x 10^6 anti-C57-SSLc zusammen mit 10 x 10^6 C57-ConA-Blasten in den einen Schwamm injiziert. Der Kontrollschwamm erhielt RPMI 1640. Die anti-C57-SSLc wurden nach 2, 3 und 4 Tagen Kultivierung gewonnen. Die Zellrekrutierung wurde nach 18 Stunden bestimmt. Für die SSLc konnte schon nach 2 Tagen Kultivierung eine spezifische Interaktion der SSLc mit den C57-Blasten demonstriert werden, denn das spezifische Transplantat rekrutierte 172 % mehr Zellen als das Kontrolltransplantat. Eine meßbare Zytotoxizität brachten die SSLc zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht auf. Die Rekrutierungskapazität der SSLc nahm bei der 3- und 4-Tage-Kultur weiterhin zu, so daß sich der Rekrutierungsindex von 2,72 bei der 2-Tage-Kultur über 3,35 bei der 3-Tage-Kultur auf 3,70 bei der 4-Tage-Kultur steigerte. Mit dem Rekrutierungsindex stieg auch die Zytotoxizität der SSLc gegenüber C57-Blasten an (Tab. 3).
Um den Einfluß der C57-ConA-Blasten auf die zelluläre Infiltration zu untersuchen, wurden im Kontrollansatz bei einer Gruppe keine SSLc, sondern nur C57-Blasten bzw. syngene BALB-Blasten in die Schwamm-Matrix-Implantate injiziert. Dabei zeigte sich eine um 58 % erhöhte lymphozytäre Infiltration im C57-Transplantat.
Um die durch C57-ConA-Blasten ausgelöste Infiltration ausschließen zu können, wurden in einem weiteren Versuchsansatz 5 x 10^6 anti-C57-SSLc zusammen mit 7 x 10^6 C57-ConA-Blasten in

...

ZEITRAUM DER SENSIBILISIERUNG DER ANTI-C57-SSLc (TG)	% LYSE GEGEN C57-BLASTEN*	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGS-INDEX	P
		ANTI-C57-SSLc UND C57-BLASTEN	RPMI 1640		
2	0	0.80 ± 0.07	0.30 ± 0.03	$2.72\ ^{3.40}_{2.18}$	< 0.01
3	7	1.23 ± 0.05	0.37 ± 0.03	$3.35\ ^{4.50}_{2.50}$	< 0.01
4	71	1.34 ± 0.17	0.35 ± 0.03	$3.70\ ^{5.89}_{2.32}$	< 0.01

* BEI EINEM EFFEKTOR: TARGET-VERHÄLTNIS VON 8 : 1

TAB. 3: Zellrekrutierung durch anti-C57-SSLc zu einem C57-Allotransplantat in Abhängigkeit von dem Sensibilisierungszeitrum dieser SSLc.

den experimentellen Schwamm injiziert, während der Kontrollschwamm 7 x 10^6 C57-ConA-Blasten erhielt. Anti-C57-SSLc wurden von 1 - 5 Tagen nach Kulturbeginn gewonnen. Die Rekrutierung wurde ebenfalls nach 18 Stunden bestimmt. Nach 1 Tag Kultivierung konnten schon zellrekrutierende anti-C57-SSLc nachgewiesen werden. Der Rekrutierungsindex betrug 1,30. Wie in dem vorherigen Ansatz steigerte sich auch in diesem Versuch der Index von der 2-Tage-Kultur (2,09) bis zur 4-Tage-Kultur (3,35). Nach 5 Kultur-Tagen wiesen SSLc mit 86 % zwar eine unverändert hohe spezifische Lyse auf (Effektor : Target-Verhältnis 8 : 1), ihre Rekrutierungskapazität war dagegen deutlich vermindert. Der Rekrutierungsindex fiel auf 1,85 ab (Abb. 8).

...

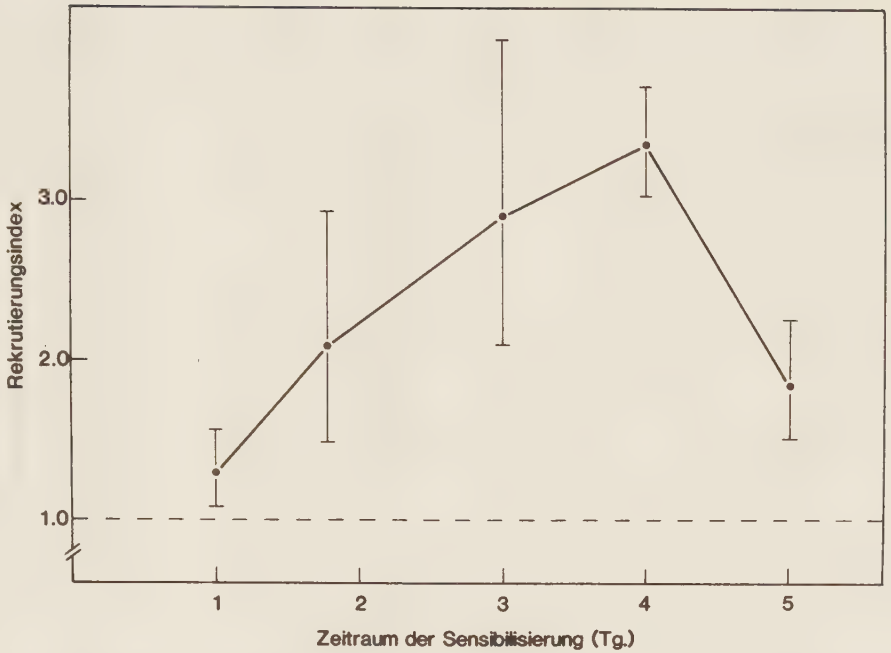

ABB. 8: Zellrekrutierung zu C57-Allotransplantaten in Abhängigkeit vom Sensibilisierungszeitraum der lokal injizierten anti-C57-SSLc.

Es besteht demnach keine Korrelation zwischen der Zellrekrutierungskapazität und der spezifischen Zytotoxizität von SSLc.

3.1.7. Effekt von in vivo generierten SSLc auf die lymphozytäre Infiltration

In allen bisherigen Experimenten wurde die lymphozytäre Infiltration, die durch in vitro gezüchtete SSLc ausgelöst wurde, getestet. Die Relevanz dieser Untersuchungen für Allotransplantate in vivo sollte im folgenden gezeigt werden.
Deshalb wurde die Rekrutierungskapazität von SSLc, die in vivo gebildet wurden, getestet. Wie unter 2.2.3. beschrieben, wurden 30×10^6 C57-Milzzellen in beide Schwämme 10 Tage nach Implantation injiziert. Nach weiteren 9 Tagen wurden alle Zellen, die die Allotransplantate infiltriert hatten, isoliert. 4×10^6 dieser anti-C57-SSLc wurden zusammen mit 6×10^6 C57- bzw. SJL-ConA-Blasten lokal in die zellfreie Schwamm-Matrix, die anderen BALB-Mäusen implantiert worden war, injiziert. Das spezifische Transplantat enthielt nach 8 Stunden 1,15 % der injizierten Aktivität, das unspezifische hingegen nur 0,64 %. Damit wurden 76 % mehr Zellen durch das spezifische Allotransplantat rekrutiert (Abb. 9).
Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß SSLc, die ein Allotransplantat in vivo infiltrieren, in ähnlicher Weise wie die in vitro gebildeten SSLc in der Lage sind, andere zirkulierende Lymphozyten zum spezifischen Allotransplantat zu rekrutieren.

3.1.8. Bestimmung der Parameter, die zur Lymphozyten-Infiltration in Schwamm-Matrix-Implantate führen

In den vorangegangenen Versuchen konnte mehrfach demonstriert werden, daß durch die Interaktion zwischen SSLc und der spezifischen Targetzelle eine lymphozytäre Infiltration ausgelöst wird. Um zu klären, ob die Interaktion die alleinige Voraussetzung für die Lymphozyten-

...

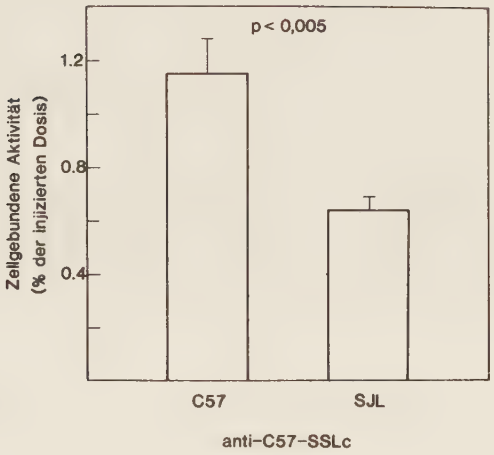

ABB. 9: Zellgebundene Aktivität in Schwamm-Matrix-Allotransplantaten nach lokaler Injektion von in vivo generierten anti-C57-SSLc.

infiltration in ein Allotransplantat ist, sollte im folgenden Versuchsabschnitt untersucht werden, inwieweit SSLc ohne Targetzellen bzw. Targetzellen ohne SSLc zu einer Lymphozytenrekrutierung fähig sind.

In der ersten Versuchsgruppe wurden 5 x 10^6 anti-C57-SSLc zusammen mit 10 x 10^6 C57-ConA-Blasten in den experimentellen Schwamm injiziert. Der Kontrollschwamm erhielt keine unspezifi-

...

schen allogenen Zellen, sondern nur RPMI 1640. Der experimentelle Schwamm war nach 18 Stunden mit 0,71 % der injizierten Gesamtaktivität infiltriert, im Vergleich zu 0,22 % im Kontrollschwamm, was einem Rekrutierungsindex von 3,24 entspricht.
Einer zweiten Versuchsgruppe wurden nur 8,5 x 10^6 anti-C57-SSLc in den experimentellen Schwamm gespritzt, der Kontrollschwamm erhielt wiederum RPMI 1640. Die SSLc konnten ohne spezifische allogene Zellen keine vermehrte Lymphozytenrekrutierung auslösen.
Der dritten Versuchsgruppe wurden 15 x 10^6 C57-ConA-Blasten ohne SSLc lokal in die experimentelle Schwamm-Matrix injiziert, der Kontrollschwamm erhielt RPMI 1640. Diese C57-ConA-Blasten für sich allein waren zu einem Rekrutierungsindex von 2,00 fähig (Abb. 10).

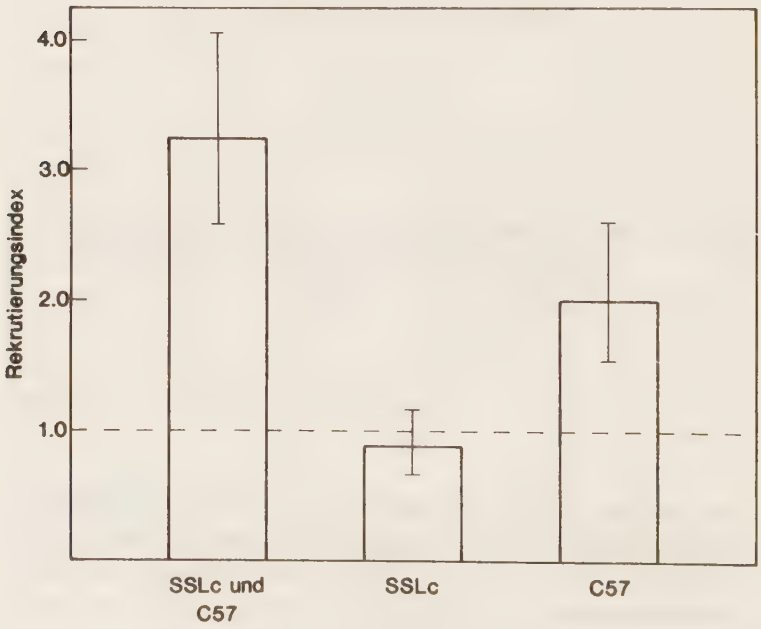

ABB. 10: Zellrekrutierung durch unterschiedliche Zellpopulationen zu Schwamm-Matrix-Implantaten.

...

Daraus ist zu entnehmen, daß SSLc per se keine Rekrutierungskapazität aufweisen. Sie können erst nach Restimulation mit der spezifischen allogenen Zelle Lymphozyten rekrutieren. C57-ConA-Blasten hingegen lösen für sich allein eine lymphozytäre Infiltration aus. Die lymphozytäre Infiltration in spezifische Allotransplantate beruht damit auf zwei unterschiedlichen immunologisch ausgelösten Mechanismen. Zum einen rufen allogene Zellen im spezifischen und unspezifischen Allotransplantat in gleicher Weise eine vermehrte Lymphozytenrekrutierung hervor. Im spezifischen Transplantat erfolgt zusätzlich eine Stimulierung der lymphozytären Infiltration durch die Interaktion zwischen SSLc und spezifischen allogenen Zellen.

...

3.2. Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung durch allogene Zellen in Schwamm-Matrix-Implantate

3.2.1. Modell

Wie aus 3.1.8 zu entnehmen ist, haben C57-ConA-Blasten per se einen starken Einfluß auf die lymphozytäre Infiltration in diese Allotransplantate. Die Wirkung allogener Zellen ohne Beteiligung von SSLc sollte daher in den folgenden Versuchen bestimmt werden.
18 Tage nach Implantation der Schwamm-Matrix wurde die Rekrutierung von Lymphozyten zu Allo- bzw. Isotransplantaten bestimmt. Dazu wurden die Schwamm-Matrix-Implantate zu bestimmten Zeiten vor Versuchsende lokal mit Zellen injiziert, wobei der experimentelle Schwamm die allogenen und der Kontrollschwamm die syngenen Zellen erhielt. Weder der experimentelle Schwamm noch der Kontrollschwamm enthielt SSLc. Zur Messung der Lymphozytenrekrutierung wurden ^{51}Cr-markierte Lymphozyten 2 Stunden vor Versuchsende i.v. injiziert.

3.2.2. Einfluss allogener Zellen auf die lymphozytäre Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate

20×10^6 allogene Zellen wurden im Vergleich zu 20×10^6 syngenen Milzzellen auf ihre Fähigkeit zur Zellrekrutierung getestet. Als allogene Zellen wurden Zellen von C57- und CBA-Mäusen verwandt. In beiden Fällen konnte nach 24 Stunden eine erhöhte Infiltration in die Allotransplantate nachgewiesen werden. Die Allotransplantate wurden mit 0,30 % bzw. 0,49 % der injizierten Gesamtaktivität signifikant stärker infiltriert als die Isotransplantate mit 0,24 % bzw. 0,29 % (Abb. 11).

...

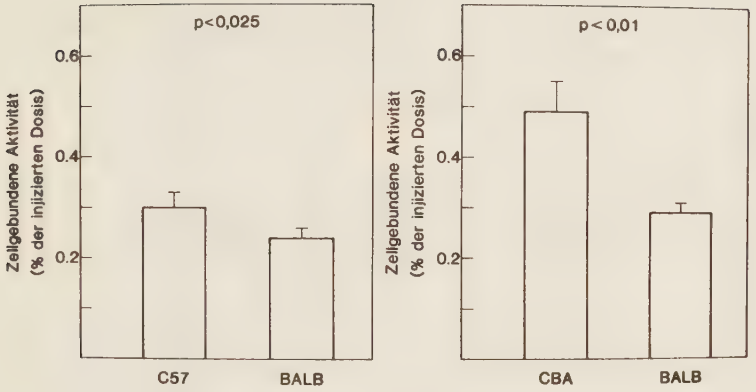

ABB. 11: Zellrekrutierung zu Schwamm-Matrix-Implantaten nach lokaler Injektion von allogenen und syngenen Milzzellen in BALB-Mäusen.

3.2.3. Zeitlicher Verlauf der Lymphozytenrekrutierung in Schwamm-Matrix-Allotransplantate durch allogene Zellen

Um den zeitlichen Verlauf der lymphozytären Infiltration in Schwamm-Matrix-Allotransplantate zu bestimmen, der unabhängig von der Wirkung von SSLc zustande kommt, wurden die Implantate mit 15 x 10^6 C57- bzw. BALB-Milzzellen injiziert.

Nach 8 Stunden konnte noch keine vermehrte Rekrutierung zum Allotransplantat nachgewiesen werden. Der früheste Zeitpunkt einer vermehrten Infiltration war nach 16 Stunden zu finden. Zu diesem Zeit-

...

ZEIT (STD)	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGSINDEX	P
	C57	BALB		
8	0.43 ± 0.01	0.44 ± 0.02	$0.97\ ^{1.09}_{0.87}$	N.S.
16	0.39 ± 0.07	0.32 ± 0.05	$1.18\ ^{1.46}_{0.96}$	< 0.05
24	0.55 ± 0.04	0.43 ± 0.04	$1.27\ ^{1.54}_{1.05}$	< 0.025
32	0.56 ± 0.04	0.41 ± 0.03	$1.33\ ^{1.57}_{1.13}$	< 0.025

TAB. 4: Lymphozytäre Infiltration in C57-Allotransplantate zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Zellinjektion.

punkt betrug der Rekrutierungsindex 1,18. Über den gesamten gemessenen Zeitraum von 8 - 32 Stunden nahm der Index kontinuierlich zu und betrug bei 32 Stunden 1,33. Dabei stieg die Aktivität im Allotransplantat von 0,43 % auf 0,56 % der Gesamtaktivität, während sie mit 0,41 % im Isotransplantat unverändert blieb (Tab. 4).

3.2.4. Zusammenhang zwischen der im Allotransplantat vorhandenen Zellzahl und der zellulären Infiltration dieser Transplantate

Im folgenden Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob die lymphozytäre Infiltration korreliert ist mit der Zahl an allogenen Zellen im Transplantat.
In die Schwamm-Matrix-Implantate wurden unterschiedliche Mengen an C57- bzw. BALB-Milzzellen injiziert. Nach lokaler Injektion von 10 x 10^6 Milzzellen konnte nach 24 Stunden keine erhöhte Infiltration nachgewiesen werden. Der Rekrutierungsindex stieg aber mit zunehmender Zellzahl linear an, so daß sich bei der Zahl von 20 x 10^6 Milzzellen ein Index von 1,28 und bei Injektion von 30 x 10^6 ein Index von 1,39 ergab (Abb. 12).
Dabei stieg die Aktivität in den Allotransplantaten von 0,31 % auf 0,46 % der Gesamtaktivität an, während die Isotransplantate mit 0,31 % bei allen Zellzahlen gleichbleibend infiltriert wurden.
Somit konnte auch für allogene Zellen eine Korrelation zwischen Zellzahl und Lymphozyteninfiltration in Allotransplantate nachgewiesen werden.

3.2.5. Effekt verschiedener allogener Zellen auf die Lymphozytenrekrutierung

Um die für die erhöhte Zellrekrutierung verantwortlichen allogenen Zellen zu charakterisieren, wurden 30 x 10^6 C57- bzw. BALB-Zellen in die Schwämme eingespritzt. Getestet wurden Milzzellen, über

...

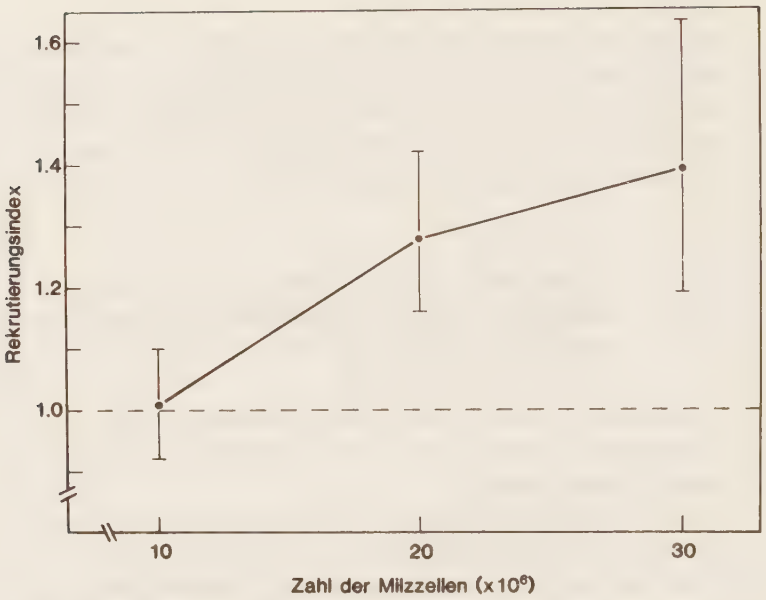

ABB. 12: Zellrekrutierung zu C57-Allotransplantaten in Abhängigkeit von der Anzahl an C57-Milzzellen im Transplantat.

Nylonwolle angereicherte T- und B-Lymphozyten, ConA-induzierte T-Lymphoblasten und LPS-induzierte B-Lymphoblasten. Dabei zeigte sich nach 24 Stunden, daß nur Zellsuspensionen, die T-Zellen enthalten, einen Rekrutierungsindex, der signifikant über 1 liegt, auslösen können. In das Milzallotransplantat wanderten 45 % mehr Zellen als in das entsprechende Isotransplantat. Der Rekrutierungsindex ließ sich durch die Injektion einer angereicherten T-Lymphozytenpopulation auf 1,79 steigern. ConA-induzierte T-Lymphoblasten konnten den Index auf 2,37 erhöhen. Angereicherte B-Lymphozyten und LPS-induzierte B-Lymphoblasten hingegen führten nicht zu

...

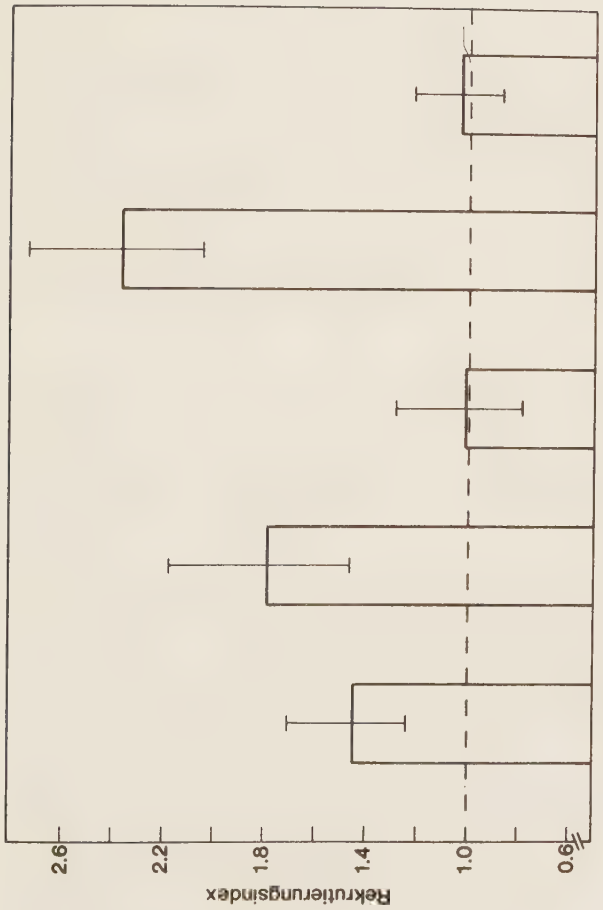

ABB. 13: Zellrekrutierung zu C57-Allotransplantaten nach lokaler Injektion von verschiedenen immunkompetenten Zellen.

einer vermehrten Lymphozytenrekrutierung. Der Index betrug 1,01 bzw. 1,03 (Abb. 13).
Daraus folgt, daß die Lymphozytenrekrutierung in Allotransplantate, die unabhängig von einem Effekt der SSLc zustande kommt, T-Zell-vermittelt ist.

...

3.3. Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung durch antiproliferativ behandelte allogene Zellen in Schwamm-Matrix-Implantate

3.3.1. Erläuterung zum Modell

Da durch allogene T-Zellen eine vermehrte lymphozytäre Infiltration ausgelöst wird, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden, inwieweit diese Infiltration durch antiproliferative Behandlung der allogenen Zellen blockiert werden kann.
Für diese Untersuchungen wurde das Modell, das unter 3.2.1. beschrieben wurde, verwandt. Dabei wurden die allogenen bzw. syngenen Zellen, die in den experimentellen Schwamm bzw. den Kontrollschwamm injiziert wurden, der gleichen Behandlungsmethode unterzogen.

3.3.2. Effekt einer Bestrahlung der allogenen Zellen

Im folgenden wurde untersucht, ob durch Bestrahlung die durch allogene T-Zellen ausgelöste lymphozytäre Infiltration verhindert werden kann.
Dazu wurden sowohl Milzzellen als auch ConA-induzierte T-Lymphoblasten mit 20 Gy bestrahlt. Kontrolltiere erhielten unbehandelte Milzzellen bzw. T-Lymphoblasten. 30×10^6 Milzzellen oder 18×10^6 T-Lymphoblasten wurden lokal in die Schwamm-Matrix injiziert. Die lymphozytäre Infiltration in die Allo- und Isotransplantate wurde 24 Stunden später gemessen.
Bei der Kontrollgruppe, die die unbehandelten C57- bzw. BALB-Milzzellen erhalten hatten, wurde das Allotransplantat mit 0,48 % der injizierten Gesamtaktivität um 27 % stärker infiltriert als das Isotransplantat mit 0,36 % der Aktivität.
Bei den bestrahlten Milzzellen konnte keine erhöhte Rekrutierung zum Allotransplantat nachgewiesen werden. Die Schwämme waren mit

...

ANZAHL UND ART DER ZELLEN	BESTRAHLUNG MIT 20 Gy	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGS-INDEX	P
		C57	BALB		
30×10^6 MILZ-ZELLEN	-	0.48 ± 0.08	0.36 ± 0.03	$1.27\ ^{1.46}_{1.10}$	< 0.005
30×10^6 MILZ-ZELLEN	+	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.02	$0.98\ ^{1.15}_{0.84}$	N.S.
18×10^6 T-LYMPHO-BLASTEN	-	1.15 ± 0.13	0.51 ± 0.06	$2.27\ ^{2.48}_{2.08}$	< 0.025
18×10^6 T-LYMPHO-BLASTEN	+	1.05 ± 0.08	0.80 ± 0.05	$1.31\ ^{1.62}_{1.05}$	< 0.025

TAB. 5: Zellrekrutierung durch unbestrahlte und bestrahlte C57-Zellen in Schwamm-Matrix-Allotransplantate.

0,36 % bzw. 0,37 % Aktivität gleich stark infiltiert worden.
In der Kontrollgruppe, der die unbehandelten T-Lymphoblasten injiziert worden waren, rekrutierten die Allotransplantate 127 % mehr Zellen als die Isotransplantate.
Die bestrahlten T-Lymphoblasten konnten ebenfalls vermehrt Zellen in das Allotransplantat rekrutieren. Der Index betrug 1,31, war damit aber signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe (Tab. 5). Damit konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit der allogenen T-Zellen zur Lymphozytenrekrutierung durch die Bestrahlung verringert wird. Die Zellrekrutierungskapazität von stimulierten und nichtstimulierten T-Zellen ist aber offensichtlich unterschiedlich sensibel gegenüber einer Bestrahlung.

3.3.3. Effekt einer Behandlung der allogenen Zellen mit Mitomycin C

Da T-Lymphoblasten eine starke zelluläre Infiltration in die Allotransplantate auslösen konnten, wurde im folgenden Experiment getestet, ob diese Fähigkeit durch Mitomycin C-Behandlung der Zellen unterbunden werden kann.
Dazu wurden ConA-induzierte T-Lymphoblasten mit Mitomycin C behandelt. Kontrolltiere erhielten unbehandelte T-Lymphoblasten. Insgesamt wurden jedem Versuchstier 18 x 10^6 C57-ConA-Blasten als allogene und gleichviele BALB-ConA-Blasten als syngene Zellen injiziert. Nach 24 Stunden betrug der Rekrutierungsindex 2,27 bei den Kontrolltieren. Die Mitomycin C-behandelten T-Lymphoblasten waren zwar noch in der Lage, signifikant vermehrt Zellen in das Allotransplantat zu rekrutieren, der Rekrutierungsindex war aber auf 1,59 verringert.
Um zu klären, ob diese Verringerung der Zellrekrutierungskapazität von allogenen Zellen durch Mitomycin C mit der Zeit stärker wird, wurde die lymphozytäre Infiltration zusätzlich nach 48 Stunden für unbehandelte und Mitomycin C-behandelte Blasten gemessen. Zu diesem Zeitpunkt konnten unbehandelte allogene Zellen noch um 93 % mehr Lymphozyten in das Allotransplantat rekrutieren. Die Mitomycin C-

...

behandelten Zellen hingegen riefen keine erhöhte Infiltration mehr hervor (Abb. 14).

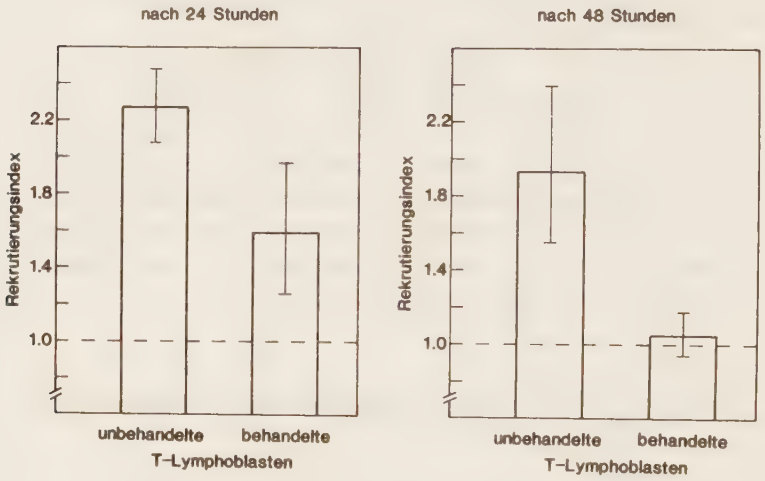

ABB. 14: Zellrekrutierung durch unbehandelte und Mitomycin C-behandelte C57-T-Lymphoblasten in Schwamm-Matrix-Allotransplantate zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Zellinjektion.

Somit konnte auch für Mitomycin C ein suppressiver Einfluß auf die Fähigkeit allogener T-Lymphoblasten zur Lymphozytenrekrutierung nachgewiesen werden. Dabei spielt offensichtlich der Beobachtungszeitraum eine wesentliche Rolle.

...

3.4. Untersuchungen zur Lymphozytenrekrutierung an immunsupprimierten Mäusen

3.4.1. Erläuterungen zur Immunsuppression

Im folgenden Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob die vermehrte Lymphozytenrekrutierung, die zum einen durch die spezifische Interaktion von SSLc mit allogenen Zellen und zum anderen durch allogene T-Zellen per se ausgelöst wird, bei immunsupprimierten Tieren blockiert ist. Die Immunsuppression wurde durch CyA, Dexamethason oder durch Ganzkörperbestrahlung der Versuchstiere erzielt. Die unter 3.1.1. und 3.2.1. beschriebenen Modelle wurden dazu verwandt.

3.4.2. Effekt von CyA auf die durch SSLc ausgelöste Lymphozytenrekrutierung

Inwieweit CyA den durch SSLc ausgelösten Zellrekrutierungseffekt unterbinden kann, sollte im folgenden untersucht werden.
Die Versuchstiere erhielten 4 x 80 mg CyA/kg Körpergewicht. Das CyA wurde 30 Stunden, 18 Stunden, 6 Stunden und unmittelbar vor der lokalen Zellinjektion am Versuchstag appliziert, um einen hohen CyA-Spiegel im Serum zu erzielen. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Allen Tieren wurden 4 x 10^6 anti-C57-SSLc und 10 x 10^6 C57- bzw. SJL-Milzzellen in die Schwamm-Matrix injiziert. Die zelluläre Infiltration wurde nach 8 Stunden gemessen.
Bei der Kontrollgruppe wanderten 0,84 % der injizierten radioaktiven Milzzellen in den spezifischen Schwamm, während der unspezifische von 0,41 % infiltriert wurde.
Bei den Versuchstieren, die mit CyA immunsupprimiert worden waren, konnte keine vermehrte Infiltration in das spezifische Transplantat gefunden werden. Dieses Transplantat rekrutierte 0,36 % der Zellen, das unspezifische 0,32 % (Abb. 15).

...

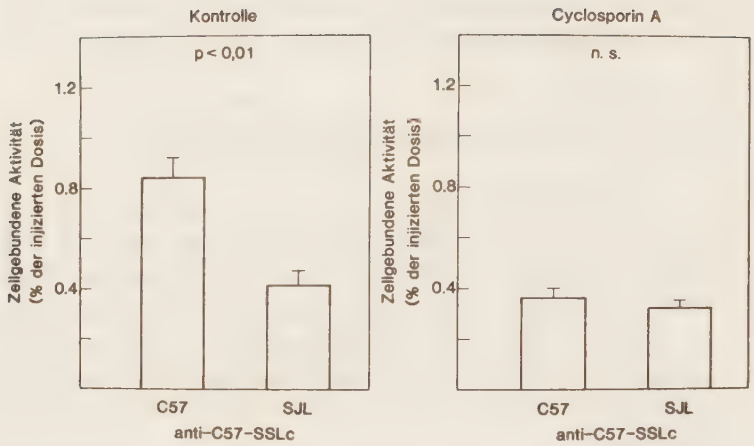

ABB. 15: Effekt von oral appliziertem CyA auf die Zellrekrutierung in spezifische und unspezifische Schwamm-Matrix-Allotransplantate nach lokaler Injektion von anti-C57-SSLc.

Damit wurde demonstriert, daß CyA einen inhibierenden Effekt auf die durch SSLc ausgelöste Zellinfiltration in Allotransplantate ausübt.

3.4.3. Effekt von CyA auf die durch allogene Zellen ausgelöste zelluläre Infiltration

Im folgenden Abschnitt sollte die Wirkung von CyA auf die durch allogene Zellen ausgelöste Lymphozytenrekrutierung bestimmt werden.

Allen Tieren wurden 30 x 10^6 C57- bzw. BALB-Milzzellen in die Implantate eingespritzt. Während Kontrolltiere nicht immunsupprimiert wurden, erfolgte die Behandlung mit CyA zu verschiedenen Zeiten und mit unterschiedlicher Dosierung. Das CyA wurde bei den ersten

...

CyA-DOSIS*	ZEITPUNKT DER CyA-APPLIKATION	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGS-INDEX	P
		C57	BALB		
--	--	0.57 ± 0.07	0.34 ± 0.05	$1.71\ ^{2.01}_{1.45}$	< 0.01
80	24 U. 1 STD. VOR ZI**	0.37 ± 0.02	0.33 ± 0.02	$1.14\ ^{1.24}_{1.04}$	< 0.025
40	24 U. 1 STD. VOR ZI	0.39 ± 0.03	0.46 ± 0.06	$0.90\ ^{1.07}_{0.76}$	N.S.
80	16 STD. NACH ZI	0.50 ± 0.04	0.40 ± 0.03	$1.28\ ^{1.47}_{1.11}$	< 0.01

* ALLE ANGABEN IN MG CyA/KG KÖRPERGEWICHT

** ZI = ZEITPUNKT DER LOKALEN ZELLINJEKTION

TAB. 6: Effekt von lokal verabreichtem CyA auf das Wanderungsverhalten von Lymphozyten in Schwamm-Matrix-Transplantate nach lokaler Injektion von allogenen und syngenen Milzzellen.

beiden Gruppen am Tag vor und zum Zeitpunkt der lokalen Zellinjektion verabreicht. Eine Gruppe erhielt 80 mg, die andere 40 mg CyA/kg Körpergewicht an beiden Tagen. Der dritten Gruppe wurde dagegen erst 16 Stunden nach Zellinjektion eine einmalige Dosis von 80 mg CyA/kg Körpergewicht appliziert. Die Infiltration in die Transplantate wurde 25 Stunden nach lokaler Zellinjektion gemessen. Bei den Kontrolltieren wurden die Allotransplantate von 0,57 % der i.v. injizierten Zellen infiltriert. Die Isotransplantate enthielten 0,34 % der Gesamtaktivität. Das entspricht einem Rekrutierungsindex von 1,71. Bei der Dosis von 1 x 80 mg CyA/kg Körpergewicht/Tag wurde das Allotransplantat 14 % stärker infiltriert als das Isotransplantat. Bei einer täglichen Gabe von 1 x 40 mg CyA/kg Körpergewicht enthielt das Allotransplantat 0,39 %, das Isotransplantat 0,46 % der Gesamtaktivität. Bei der Versuchsgruppe, die das CyA erst 16 Stunden nach Zellinjektion erhalten hatte, wurde das Allotransplantat von 28 % mehr Zellen infiltriert. Damit ist der Rekrutierungsindex zwar signifikant größer als 1, aber deutlich niedriger als bei der Kontrollgruppe (Tab. 6).
Aus den Untersuchungen ist zu schließen, daß CyA die durch allogene Zellen ausgelöste Lymphozyteninfiltration blockiert, wenn es vor der lokalen Zellinjektion verabreicht wird. Bei der Applikation zu einem späteren Zeitpunkt kann CyA die Infiltration lediglich vermindern.

3.4.4. Effekt von Dexamethason auf die durch allogene Zellen ausgelöste zelluläre Infiltration

Im folgenden wurde der Effekt einer lokalen Gabe von Dexamethason auf die durch allogene Zellen ausgelöste Lymphozytenrekrutierung untersucht.
Dazu wurden die Schwamm-Matrix-Implantate mit 30 x 10^6 C57- bzw. BALB-Milzzellen injiziert. Eine Kontrollgruppe blieb unbehandelt, während bei einer anderen Gruppe die Zellen zusammen mit 26µg Dexamethason eingespritzt wurden. Die lymphozytäre Infiltration

...

wurde nach 24 Stunden gemessen.
Die Allotransplantate der Kontrollgruppe wurden von 27 % mehr Zellen infiltriert als die Isotransplantate. Die Aktivität im Allotransplantat betrug 0,48 %, die im Isotransplantat 0,36 %. Die Implantate, die zusätzlich zu den unbehandelten Milzzellen Dexamethason enthielten, rekrutierten mit 0,25 % und 0,26 % Aktivität wesentlich weniger Zellen. Gleichzeitig war keine verstärkte Infiltration in das Allotransplantat mehr nachweisbar (Tab. 7).

DEXAMETHASON-DOSIS (µG/SCHWAMM)	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT C57	BALB	REKRUTIERUNGS-INDEX	P
-	0.48 ± 0.08	0.36 ± 0.03	$1.27\ ^{1.46}_{1.10}$	< 0.005
26	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02	$0.99\ ^{1.08}_{0.90}$	N.S.

TAB. 7: Effekt von lokal injiziertem Dexamethason auf das Wanderungsverhalten von Lymphozyten in Schwamm-Matrix-Transplantate nach lokaler Injektion von allogenen und syngenen Milzzellen.

Somit konnte auch für Dexamethason eine Blockierung der Zellrekrutierung, die durch allogene Zellen in Schwamm-Matrix-Allotransplantate ausgelöst wird, nachgewiesen werden.

3.4.5. WIRKUNG VON ALLOGENEN ZELLEN AUF DIE LYMPHOZYTÄRE INFILTRATION IN BESTRAHLTEN MÄUSEN

Bei der Injektion von allogenen Zellen in ein Empfängertier findet eine Interaktion zwischen allogenen Zellen und Empfängerzellen statt.

...

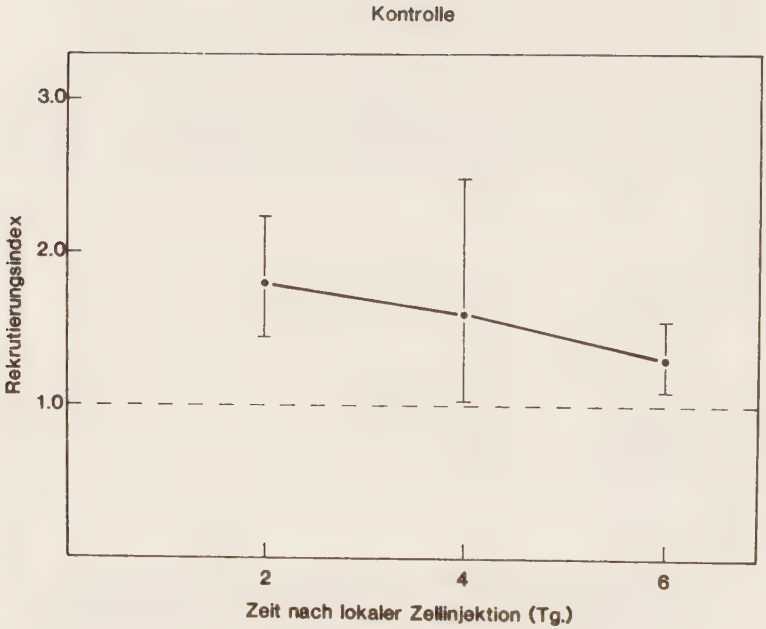

ABB. 16: Zellrekrutierung zu C57-Allotransplantaten an verschiedenen Tagen nach lokaler Injektion von allogenen Zellen.

...

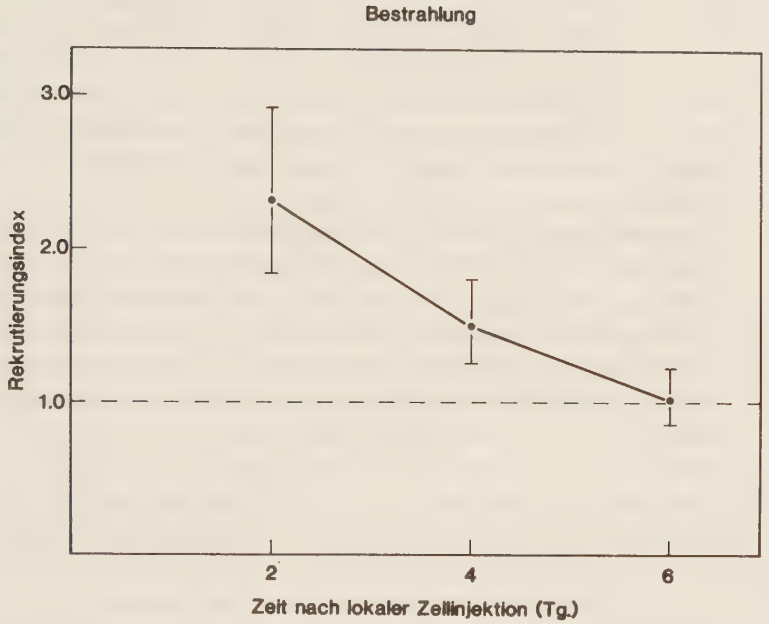

ABB. 17: Effekt einer Ganzkörperbestrahlung auf die Zellrekrutierung zu C57-Allotransplantaten an verschiedenen Tagen nach lokaler Injektion von allogenen Milzzellen.

...

In allen bisherigen Versuchen konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob die allogenen Zellen allein die Lymphozyteninfiltration auslösen oder ob diese Infiltration durch eine Reaktion der Empfängerlymphozyten gegen die allogenen Zellen gesteigert wird. Aus diesem Grund sollte im folgenden Versuch getestet werden, ob unbehandelte allogene Zellen in bestrahlten Tieren eine vermehrte Zellinfiltration auslösen können.

Dazu wurden Versuchstiere 12 Tage nach Implantation mit 5 Gy bestrahlt. Diese Dosis ist für die Mäuse sublethal und führt zu einer starken Immunsuppression. Kontrolltiere wurden nicht bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden den Mäusen 23 x 10^6 C57- bzw. BALB-Milzzellen gespritzt. Die lymphozytäre Infiltration in die Transplantate wurde nach 2, 4 und 6 Tagen bei bestrahlten und unbestrahlten Mäusen gemessen.

Am Tag 2 ergab sich bei den unbestrahlten Mäusen ein Rekrutierungsindex von 1,80. Gleichzeitig war am Tag 2 der Höhepunkt der Infiltration. Der Rekrutierungsindex ging auf 1,60 nach 4 Tagen und auf 1,30 nach 6 Tagen zurück (Abb. 16).

Bei den bestrahlten Versuchstieren war der Rekrutierungsindex von 2,32 nach 2 Tagen deutlich höher als bei den Kontrolltieren. Nach 4 Tagen betrug der Index nur noch 1,50 und nach 6 Tagen konnte bei den immunsupprimierten Tieren keine vermehrte Infiltration in das Allotransplantat mehr nachgewiesen werden (Abb. 17).

Dies läßt den Schluß zu, daß die Lymphozytenrekrutierung in den ersten 4 Tagen nach lokaler Zellinjektion von den allogenen Zellen ausgelöst wird und am 6. Tag die Immunantwort des Empfängertieres gegen die allogenen Zellen zum Tragen kommt.

...

3.5. Untersuchungen zum Zellrekrutierungseffekt im xenogenen System

3.5.1. Erläuterungen zum xenogenen System

In allen bisher durchgeführten Versuchen wurden entweder syngene SSLc oder allogene Zellen auf ihre Rekrutierungskapazität in BALB-Mäusen getestet. Dabei blieb die Frage offen, ob der Zellrekrutierungsmechanismus auch im xenogenen System wirksam ist. Deshalb wurden humane SSLc mit spezifischen bzw. unspezifischen Targetzellen in Schwamm-Matrix-Implantate injiziert, die BALB-Mäusen implantiert worden waren. Außerdem wurden humane immunkompetente Zellen in die Schwämme eingespritzt. Anschließend wurde die Rekrutierungskapazität dieser Zellen auf BALB-Milzzellen bestimmt.

3.5.2. Einfluss von xenogenen SSLc auf die lymphozytäre Infiltration

In zwei voneinander unabhängigen Versuchen wurden humane SSLc mit spezifischen bzw. unspezifischen PHA-Blasten lokal in die Schwamm-Matrix injiziert. Die HLA-Antigene der jeweiligen Zellpopulationen sind in Tab. 8 angegeben. Im ersten Versuch wurden 5×10^6 SSLc mit 5×10^6 Blasten, im zweiten Versuch 20×10^6 SSLc mit 9×10^6 Blasten gespritzt. Die lymphozytäre Infiltration wurde nach 8 Stunden gemessen. Dabei zeigte sich, daß auch bei Injektion von xenogenen Effektor- und Targetzellen eine vermehrte Infiltration in die spezifischen Transplantate stattfand. Diese rekrutierten mit 29 % bzw. 22 % signifikant mehr Zellen als die unspezifischen Transplantate (Tab. 9). In der CML ergab sich eine spezifische Zytotoxizität der SSLc von 60 % gegenüber einer unspezifischen von 30 % bei einem Effektor : Target-Verhältnis von 100 : 1.

...

TYPISIERTE ZELLEN	HLA-A, -B, -C UND -DR-ANTIGENE			
A_1	A1, A2	B7, B8, Bw6	Cw7	DR2, DR5
B_1	A1, A2	B8, B18, Bw6	Cw7	DR3, DR5
C_1	A1, A3	B15, Bw6	Cw2, Cw3	DR1, DR4
A_2	A1, A29	B8, Bw44, Bw4, Bw6	Cw7	DR2, DR7
B_2	A1, Aw24	B8, Bw39, Bw6	Cw7	DR3, DR8
C_2	A1, A3	B15, Bw6	Cw2, Cw3	DR1, DR4

TAB. 8: HLA-Antigene der humanen SSLc ($A_{1(2)}$), der spezifischen Stimulatorzellen ($B_{1(2)}$) und der unspezifischen Kontrollzellen ($C_{1(2)}$).

SSLc	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGSINDEX	P
	$B_{1(2)}$	$C_{1(2)}$		
ANTI-B_1-SSLc$_{A1}$	0.59 ± 0.02	0.46 ± 0.03	$1.29\ ^{1.45}_{1.15}$	< 0.01
ANTI-B_2-SSLc$_{A2}$	0.80 ± 0.04	0.66 ± 0.05	$1.22\ ^{1.42}_{1.06}$	< 0.025

TAB. 9: Rekrutierung von BALB-Milzzellen zu Schwamm-Matrix-Xenotransplantaten nach lokaler Injektion von humanen SSLc und spezifischen bzw. unspezifischen PHA-Blasten.

...

3.5.3. Zeitlicher Verlauf der Lymphozytenrekrutierung in xenogene Schwamm-Matrix-Transplantate

Da die Intensität der Lymphozytenrekrutierung bei allogenen Zellen stark zeitabhängig ist, sollte im folgenden Versuch die Rekrutierung durch humane Zellen in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt werden. Zusätzlich sollte gezeigt werden, ob die durch allogene Zellen ausgelöste Lymphozytenrekrutierung auf das xenogene System übertragbar ist.

Dazu wurden BALB-Mäusen 10 x 10^6 humane PHA-Blasten in den einen Schwamm gespritzt, während der Kontrollschwamm RPMI 1640 erhielt. Schon nach 8 Stunden zeigte sich ein Rekrutierungsindex von 1,66. Dieser fiel aber nach 16 Stunden auf 1,23 und nach 24 Stunden auf 1,14 ab (Abb. 18).

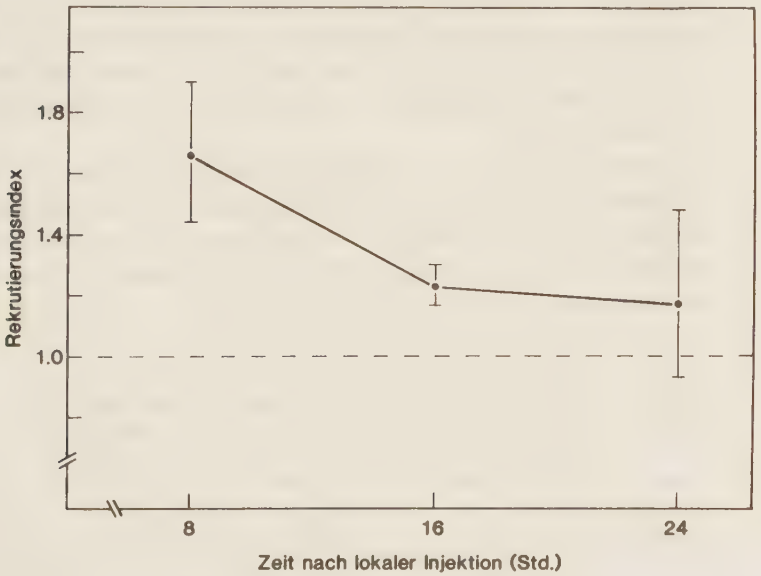

ABB. 18: Zeitlicher Verlauf der Zellrekrutierung von BALB-Milzzellen zu Schwamm-Matrix-Xenotransplantaten nach lokaler Injektion von humanen PHA-Blasten.

...

Somit besitzen immunkompetente Zellen auch in einem xenogenen Empfänger eine signifikante Zellrekrutierungskapazität. Zeitlich ist der Verlauf der Lymphozytenrekrutierung in Xenotransplantate allerdings verschieden von der Rekrutierung in Allotransplantate.

3.5.4. Wirkung verschiedener Zellen auf die lymphozytäre Infiltration in Schwamm-Matrix-Xenotransplantate

Um den Einfluß verschiedener humaner Zellen auf die Lymphozytenrekrutierung in BALB-Mäusen zu bestimmen, wurden Zellen aus dem peripheren Blut im Vergleich zu PHA-Blasten getestet. Die Zellen stammten von derselben Person, um den Einfluß von Antigendifferenzen auf dem HLA-Locus ausschließen zu können.
Einer Gruppe wurden 15 x 10^6 der peripheren Blutlymphozyten (PBL), der anderen Gruppe 15 x 10^6 PHA-Blasten in den experimentellen Schwamm injiziert, während die Kontrollschwämme RPMI 1640 erhielten. Die Infiltration von BALB-Milzzellen in die einzelnen Schwämme wurde nach 8 Stunden gemessen.
Die PBL rekrutierten 0,48 % der BALB-Milzzellen, die Kontrollschwämme enthielten 0,33 %. Damit ergab sich ein Index von 1,42. Die PHA-Xenotransplantate enthielten 0,64 % der Gesamtaktivität und waren dadurch um 83 % stärker als die Kontrolltransplantate infiltriert, die 0,35 % der Aktivität enthielten (Tab. 10).

ART DER ZELLEN	% ZELLGEBUNDENE AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		REKRUTIERUNGS-INDEX	P
	HUMAN	RPMI 1640		
PBL	0.48 ± 0.05	0.33 ± 0.02	$1.42\ ^{1.80}_{1.12}$	< 0.025
PHA-BLASTEN	0.64 ± 0.05	0.35 ± 0.02	$1.83\ ^{2.12}_{1.59}$	< 0.01

TAB. 10: Rekrutierung von BALB-Milzzellen zu Schwamm-Matrix-Xenotransplantaten nach lokaler Injektion von verschiedenen humanen Zellen.

...

Dies Ergebnis zeigt, daß auch xenogene T-Lymphoblasten eine stärkere Infiltration als xenogene nicht-sensibilisierte kleine Lymphozyten auslösen.

...

3.6. Untersuchungen zur lokalen Gefässpermeabilität und Durchblutung

3.6.1. Modell

Unter bestimmten Versuchsbedingungen kann eine direkte Abhängigkeit zwischen der zellulären Infiltration und der lokalen Gefäßpermeabilität bzw. Durchblutung nachgewiesen werden. Daher wurde im folgenden untersucht, inwieweit der durch SSLc hervorgerufene Zellrekrutierungseffekt mit einer Erhöhung der beiden Parameter korreliert ist. Dazu wurden SSLc zusammen mit spezifischen allogenen Zellen in den experimentellen Schwamm injiziert. Der Kontrollschwamm erhielt SSLc und unspezifische allogene Zellen. 2 Stunden vor Versuchsende wurde ^{125}J-Humanalbumin zur Messung der Permeabilität i.v. injiziert. Zur Bestimmung der Durchblutung wurde ^{86}RbCl 45 Sekunden vor Versuchsende i.v. verabreicht. Der Zeitraum zwischen lokaler Zellinjektion und Versuchsende ist bei den Versuchen im einzelnen angegeben.

3.6.2. Veränderungen der lokalen Gefässpermeabilität und Durchblutung in Abhängigkeit von der Zeit

Wie unter 3.1.3. beschrieben, wurden 5 x 10^6 anti-C57-SSLc zusammen mit 10 x 10^6 C57- bzw. SJL-ConA-Blasten lokal in die Schwamm-Matrix injiziert. Die lokale Gefäßpermeabilität und Durchblutung wurde nach 4, 8, 12, 16 und 24 Stunden bestimmt.
Die Aktivität an ^{125}J-Humanalbumin im spezifischen Transplantat betrug nach 4 Stunden 1,75 % der injizierten Gesamtaktivität. Nach 8 Stunden war sie sprunghaft auf 4,52 % gestiegen. Das Maximum war nach 12 Stunden mit 4,84 % erreicht. Anschließend fiel die Aktivität in diesem Transplantat auf 3,53 % nach 18 Stunden und auf 2,53 % nach 24 Stunden ab.
Im unspezifischen Transplantat stieg die Aktivität kontinuierlich über den ganzen gemessenen Zeitraum an. So betrug sie nach 4 Stunden 1,47 % und nach 24 Stunden 2,91 %.

...

Ein signifikant erhöhter Gefäßpermeabilitätsindex von 2,25 konnte erstmals nach 8 Stunden errechnet werden. Der Index fiel anschliessend über 2,03 nach 12 Stunden und 1,36 nach 18 Stunden ab. Da die Aktivität nach 24 Stunden im unspezifischen Transplantat höher war als im spezifischen, ergab sich ein Index von 0,87 (Abb. 19).
Der Durchblutungsindex hatte mit 1,26 seinen Höhepunkt ebenfalls nach 8 Stunden. Für ihn konnte zu keinem anderen Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden (Abb. 20).

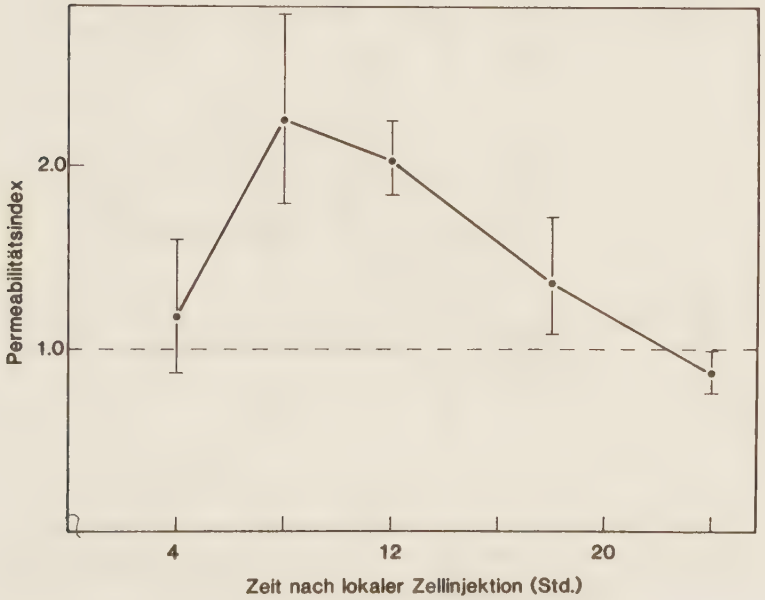

ABB. 19: Veränderung der Gefäßpermeabilität in einem C57-Allotransplantat zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Injektion von anti-C57-SSLc.

...

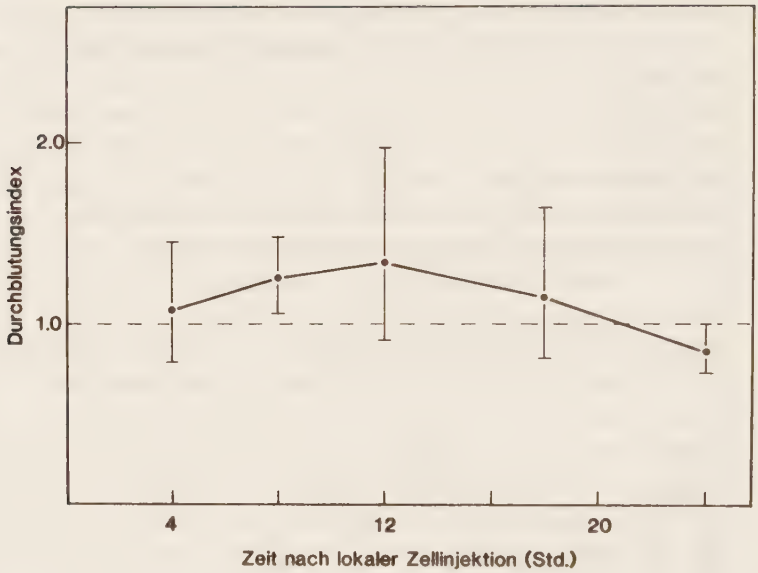

ABB. 20: Veränderung der Durchblutung in einem C57-Allotransplantat zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Injektion von anti-C57-SSLc.

Daraus folgt, daß durch die Interaktion der SSLc mit den spezifischen allogenen Zellen eine Erhöhung der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung stattfindet.

3.6.3. ABHÄNGIGKEIT DER LOKALEN GEFÄSSPERMEABILITÄT VON DER ANZAHL AN ZELLEN IM TRANSPLANTAT

Wie unter 3.1.4. beschrieben, wurden verschiedene Mengen an anti-C57-SSLc gemeinsam mit 10 x 10^6 C57- bzw. SJL-ConA-Blasten in die

...

ANZAHL DER SSLc IM TRANSPLANTAT ($x10^6$)	% AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		PERMEABILITÄTS-INDEX	P
	C57	SJL		
0.75	1.61 ± 0.15	1.36 ± 0.09	$1.18\ ^{1.62}_{0.86}$	N.S.
1.25	1.82 ± 0.09	1.39 ± 0.12	$1.33\ ^{1.66}_{1.06}$	< 0.025
2.5	2.25 ± 0.30	1.37 ± 0.16	$1.60\ ^{2.02}_{1.27}$	< 0.005
5	2.46 ± 0.22	1.25 ± 0.09	$1.95\ ^{2.24}_{1.70}$	< 0.005

TAB. 11: Gefäßpermeabilität in Schwamm-Matrix-Allotransplantaten in Abhängigkeit von der Anzahl an anti-C57-SSLc im Transplantat.

ANZAHL AN ALLOGENEN BLASTEN IM TRANSPLANTAT ($x10^6$)	% AKTIVITÄT IM TRANSPLANTAT		PERMEABILITÄTS-INDEX	P
	C57	SJL		
1.25	3.19 ± 0.23	2.57 ± 0.18	$1.24\ ^{1.56}_{0.99}$	< 0.05
2.5	3.08 ± 0.28	2.20 ± 0.15	$1.38\ ^{1.76}_{1.08}$	< 0.025
5	3.39 ± 0.30	2.02 ± 0.18	$1.67\ ^{2.02}_{1.39}$	< 0.01
10	3.82 ± 0.16	2.19 ± 0.10	$1.74\ ^{2.06}_{1.47}$	< 0.01

TAB. 12: Gefäßpermeabilität in Schwamm-Matrix-Allotransplantaten nach lokaler Injektion von anti-C57-SSLc in Abhängigkeit von der Anzahl an allogenen Lymphoblasten im Transplantat.

Schwämme gespritzt. Nach Injektion von 1,25 x 10^6 SSLc fand sich nach 8 Stunden im spezifischen Transplantat eine Aktivität von 1,82 % der Gesamtaktivität an ^{125}J-Albumin. Diese lag um 33 % höher als die Aktivität von 1,39 % im unspezifischen Transplantat. Bei steigenden Mengen an SSLc blieb die Aktivität im SJL-Transplantat unverändert. Die Aktivität im spezifischen C57-Transplantat nahm dagegen mit der steigenden Zellzahl kontinuierlich zu. Der Permeabilitätsindex stieg bis auf 1,95 bei Injektion von 5 x 10^6 SSLc (Tab. 11).
Um die Abhängigkeit der lokalen Gefäßpermeabilität von der Zahl der allogenen Zellen im Transplantat zu bestimmen, wurden 5 x 10^6 anti-C57-SSLc mit verschiedenen Zahlen an C57- bzw. SJL-ConA-Blasten lokal in die Schwamm-Matrix injiziert. Für 1,25 x 10^6 Blasten ergab sich ein Permeabilitätsindex von 1,24. Bei steigender Blastenzahl erhöhte sich die Aktivität im spezifischen Transplantat, während sie im unspezifischen unverändert blieb. Der Index betrug bei 10 x 10^6 Blasten 1,74 (Tab. 12).
Damit konnte auch für die lokale Gefäßpermeabilität eine Korrelation zwischen Zellzahl und Permeabilitätsveränderung nachgewiesen werden.

...

4. DISKUSSION

4.1. VERSUCHSMODELL

Im Rahmen der Transplantationsimmunologie spielen zelluläre Immunreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Transplantatabstoßung. Zu diesem Zeitpunkt sind die Transplantate massiv zellulär infiltriert, wobei vor allem den Effektorlymphozyten im Transplantat eine große Bedeutung zugeordnet wird. Aus diesem Grund wurde in den verschiedensten Transplantatmodellen (7,11, 71,134,145) versucht, die Zellinfiltrate zu charakterisieren und einen Zusammenhang zwischen diesen Zellen und dem Zeitpunkt der Abstoßung darzustellen. Über die Charakterisierung der Zellinfiltrate hinaus wurde die Migration verschiedensten radioaktiv markierter Zellpopulationen zu Organtransplantaten von diserven Arbeitsgruppen (14,30,99,105,135) bestimmt. Dadurch wurde nachgewiesen, daß SSLc bevorzugt in das die sensibilisierenden Alloantigene tragende Transplantat wandern (30,105,135). Darüber hinaus werden aber auch andere Zellen rekrutiert (14,99). Die Mechanismen hingegen, die zu dieser Akkumulation von Zellen führen, sind bisher wenig untersucht worden.

Auf der Suche nach Materialien zur chirurgischen Rekonstruktion von Körperteilen wurde erstmals eine Schwamm-Matrix von GRINDLAY (56) verwendet. Das Einwachsen von Bindegewebe in diese Matrix wurde von ihm und BOUCEK (19) untersucht. Die durch diese Schwamm-Matrix ausgelöste unspezifische Entzündungsreaktion wurde von anderen Arbeitsgruppen (20,33,52,143,147) ausgenutzt, um Medikamente auf ihre entzündungshemmende Wirkung zu testen.

Daß diese Schwamm-Matrix wie ein Organtransplantat abgestoßen wird, wenn sie mit allogenen Peritonealmakrophagen bedeckt ist, konnte erstmals von ROBERTS (108) gezeigt werden. Von ihm und anderen (7, 144) wurde nachgewiesen, daß die Zellinfiltrate denen von Organtransplantaten (127,145) entsprechen. Dabei wurde deutlich, daß

...

ein Vorteil dieses Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modells darin besteht, die infiltrierten Zellen durch mechanisches Pressen isolieren zu können und damit den Einfluß von Enzymen auf Oberflächenstrukturen der Zellen zu umgehen. HOPT (67) konnte am Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modell erstmals zeigen, daß die spezifische Zell-Zell-Interaktion zwischen SSLc und spezifischer Targetzelle eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung anderer zirkulierender Lymphozyten zum Transplantat ist. Die Rekrutierung selbst beruht aber auf einem unspezifischen Mechanismus, so daß SSLc und auch nicht sensibilisierte Lymphozyten rekrutiert werden.

Das Schwamm-Matrix-Allotransplantat-Modell eignet sich für Untersuchungen der Mechanismen der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate hervorragend. Das Modell bietet die Möglichkeiten, sowohl Zahl und Art der lokal in die Schwamm-Matrix injizierten Zellen als auch Beginn und Ende der Immunreaktion beliebig zu variieren. Die einzelnen Faktoren sind dabei in jedem Fall genau definiert und damit produzierbar. Derartige Untersuchungen sind in anderen Organtransplantat-Modellen nicht möglich. Da in dem von ROBERTS (108) verwandten Modell die Bedeckung der Schwamm-Matrix mit Peritonealmakrophagen einen Unsicherheitsfaktor darstellt, weil sowohl die Zahl als auch die Art der allogenen Zellen nicht genau definiert ist, wurden alle Untersuchungen in dieser Arbeit an zellfreien Schwamm-Matrix-Implantaten durchgeführt. Durch die oben erwähnte unspezifische Entzündungsreaktion werden die Schwämme vaskularisiert. Die poröse Struktur macht es möglich, daß ein bestimmtes Volumen an Flüssigkeit aufgenommen werden kann und sich die mit der Flüssigkeit injizierten Zellen gleichmäßig im Schwamm ausbreiten können. Dadurch beginnt die Immunreaktion im ganzen Transplantat zum gleichen Zeitpunkt. Immunreaktionen der Empfängertiere gegen die lokal in die Schwamm-Matrix injizierten allogenen Zellen können ausgeschlossen werden, da die Zeiträume zwischen Zellinjektion und Versuchsende nur wenige Stunden betragen. Aus diesem Grund wurde das Modell für Studien über lymphozytäre Infiltrationen in Allotransplantate herangezogen.

...

4.2. Einfluss von SSLc auf die zelluläre Infiltration

Schon mehrfach konnte in verschiedensten Modellen gezeigt werden, daß SSLc bevorzugt zu dem Transplantat wandern, das die sensibilisierenden Antigene trägt (8,30,45,67). Ähnliche Ergebnisse haben Studien an Modellen der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion ergeben (4,74). NEMLANDER (95) konnte demonstrieren, daß Blasten als erste ein Transplantat in vivo infiltrieren. Dies beruht auf der großen Mobilität von Lymphoblasten, die von einigen Autoren in vitro (66,118) und in vivo (104) nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde in vitro Chemotaxis für Lymphoblasten demonstriert (118). NEMLANDER (95) wies außerdem nach, daß die Blasten bevorzugt im Transplantat bleiben. Dies ermöglicht eine verstärkte spezifische Interaktion der SSLc mit dem Antigen (67,74).

In den unter 3.1.2. geführten Untersuchungen konnte in Analogie dazu nachgewiesen werden, daß SSLc mit den spezifischen allogenen Zellen direkt interagieren. Durch diese Interaktion wird eine vermehrte Infiltration in das spezifische Transplantat ausgelöst.

Die lymphozytäre Infiltration ist dabei direkt korreliert mit der Anzahl an SSLc im Transplantat (Abb. 6). Da die SSLc Rezeptoren für die spezifischen allogenen Zellen besitzen, können durch eine Erhöhung der Anzahl an SSLc die Zell-Zell-Interaktionen im Transplantat zunehmen. Diese bewirken dann ein vermehrtes Einströmen von Lymphozyten. Zusätzlich besteht in vitro eine Adhärenz von Effektorlymphozyten an spezifische allogene Zellen (22,35,94), worauf auch EMESON (44) für die in vivo-Situation hingewiesen hat. Eine Erhöhung der Zahl an SSLc im unspezifischen Transplantat dagegen führte zu keiner vermehrten Infiltration, so daß unspezifische Mechanismen dabei ausgeschlossen sind.

Auch an Modellen der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion konnte gezeigt werden, daß die Anzahl an Effektorlymphozyten eine große Rolle spielt (4,47).

Aus den Untersuchungen von 3.1.7. ist zu entnehmen, daß eine Rekru-

...

tierungskapazität nicht nur für in vitro generierte SSLc besteht, sondern daß dieses Phänomen der in vivo-Situation entspricht. Aus dem zeitlichen Verlauf der Lymphozytenrekrutierung (3.1.3.) geht hervor, daß die Intensität der lymphozytären Infiltration im spezifischen und unspezifischen Transplantat stark zeitabhängig ist. Der Höhepunkt der Rekrutierung durch SSLc zum spezifischen Transplantat trat 12 Stunden nach lokaler Zellinjektion ein. Das bedeutet, daß nicht der direkte Zellkontakt sofort zu einer Auslösung der Effektes führt, sondern ein gewisser Zeitraum benötigt wird, um eine Lymphozytenrekrutierung auszulösen. Die zellgebundene Aktivität im unspezifischen Transplantat nahm langsamer, aber doch kontinuierlich zu, so daß die Aktivität nach 24 Stunden gleich hoch war wie im spezifischen Transplantat. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß nicht-sensibilisierte Lymphozyten, die sich im Transplantat befinden, durch die allogenen Zellen eine Sensibilisierung erfahren und daraufhin eine Infiltration auslösen. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die Effektivität der SSLc im spezifischen Transplantat erschöpft ist oder ein Auswandern dieser Zellen aus beiden Transplantaten stattfindet. Ein Auswandern der SSLc aus dem Transplantat (59) in die regionalen Lymphknoten (35, 82) ist schon nachgewiesen worden. In beiden oben erwähnten Fällen käme dann in diesem Fall im spezifischen bzw. unspezifischen Transplantat nur noch die Wirkung der allogenen Zellen, die später diskutiert wird, zum Tragen.

Im spezifischen Transplantat werden die SSLc mit dem spezifischen Antigen restimuliert. In vitro hat diese Restimulation eine starke Proliferation zur Folge (5,63).In den Untersuchungen von HOPT (68) konnte aber ausgeschlossen werden, daß eine Zellteilung der SSLc Voraussetzung für die Ingangsetzung einer vermehrten Infiltration in Allotransplantate ist.Messungen zur verzögerten Überempfindlichkeit haben zu gleichen Ergebnissen geführt (50,77,140). In vitro konnte NICHOLS (97) demonstrieren, daß SSLc, die an ihrer Proliferation durch Bestrahlung gehemmt worden waren, noch zu einer spezifischen Lyse fähig waren. Dementsprechend konnte auch für

...

bestrahlte Zellen noch eine Lymphokinproduktion nachgewiesen werden (48,143).
In 3.1.6. wurde untersucht, welchen Einfluß der Sensibilisierungszeitraum auf die Zellrekrutierungskapazität von SSLc hat. Dabei zeigte sich eindeutig, daß ein kurzer Zeitraum zur Sensibilisierung der Effektorzellen ausreicht und zytotoxische T-Zellen keine Bedingung für die Auslösung des Effektes sind. Wahrscheinlich sind wie bei der Reaktion der verzögerten Überempfindlichkeit verschiedene T-Zell-Subpopulationen bei der Auslösung der Rekrutierung beteiligt. Diese üben möglicherweise einen additiven Effekt aus, denn der Höhepunkt der Zellrekrutierungskapazität von SSLc findet sich nach einer Sensibilisierungsphase von 4 Tagen. In der 3-Tage-Kultur konnten kaum zytotoxische Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen riefen aber eine starke Infiltration hervor, die demzufolge auf eine andere T-Zell-Subpopulation zurückzuführen ist. Dahingegen lösten die stark zytotoxisch wirkenden Zellen aus der 5-Tage-Kultur nur eine geringere Infiltration aus.
T-Zellen wird nicht nur eine große Bedeutung bei der Abstoßung eines Allotransplantates (58,111) zugeordnet, sondern auch bei den Reaktionen der verzögerten Überempfindlichkeit (88,122,136).
CANTOR (25) konnte verschiedene T-Zell-Funktionen in vitro mit den Oberflächenantigenen verschiedener T-Zell-Subpopulationen in Zusammenhang bringen. Danach werden heute verschiedene T-Zell-Subpopulationen nach ihrer Funktion unterschieden: Die T-Helferzellen ($Lyt\text{-}1^+$), T-Suppressorzellen ($Lyt\text{-}2^+$) und die zytotoxischen T-Zellen-($Lyt\text{-}2^+$). Die T-Zellen der verzögerten Überempfindlichkeit sind sowohl $Lyt\text{-}1^+$ als auch $Lyt\text{-}2^+$ (47,80,123,140). T-Zellen mit den entsprechenden Antigenen werden auch in der gemischten Lymphozytenkultur gebildet (25,67).
Da SSLc nach 3 Tagen Kultivierung kaum zytotoxische Zellen aufweisen, scheint die Zellrekrutierungskapazität dieser SSLc durch T-Helferzellen vermittelt zu sein. Ihre Wirkung beruht vermutlich wie bei den Zellen vom Typ der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion auf einer starken Lymphokinproduktion.

...

Ob neben den Lyt-1$^+$ Helferzellen auch noch zytotoxische Lymphozyten einen Einfluß auf die Lymphozytenrekrutierung haben, kann auf Grund dieser Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden. Desgleichen bleibt unklar, inwieweit eine lokale Zellproliferation zu der Lymphozytenakkumulation in einem Allotransplantat beiträgt.
Seit den Untersuchungen von BOREL (16) ist die immunsuppressive Wirkung von CyA für in vivo und in vitro ablaufende Reaktionen bekannt. In einer späteren Arbeit wies dieser Autor (17) auf die selektive Wirkung dieses Agens auf T-Lymphozyten hin. Da CyA im Vergleich zu anderen immunsuppressiven Medikamenten eine geringe Myelotoxizität aufweist (17), spielt dieses Medikament in der Transplantationsimmunologie eine große Rolle. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß CyA einen positiven Effekt auf die Überlebenszeit von Transplantaten hat (15,18). Dementsprechend konnte in vitro demonstriert werden, daß eine Verminderung der Proliferation in Gegenwart von CyA eintritt (65). Diese beruht auf der Unterdrükkung der Interleukin 2-Bildung (6,24). CyA hat sowohl eine Wirkung auf die primäre als auch auf die sekundäre Immunantwort (16,41).
In Versuchen zur verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion konnte die suppressive Wirkung auf Immunreaktionen ebenfalls bestätigt werden (17,133).
In den hier geführten Untersuchungen (3.4.2.) konnte nach der oralen Applikation von CyA keine vermehrte Lymphozytenrekrutierung zum spezifischen Transplantat mehr nachgewiesen werden. ALI (3) konnte analog dazu demonstrieren, daß nach Antigenstimulation in vivo die Akkumulation von Lymphozyten im regionalen Lymphknoten durch CyA beeinträchtigt ist.
Die Lymphozyteninfiltration in das unspezifische Transplantat war dagegen nach oraler CyA-Gabe nicht wesentlich vermindert.
Durch das CyA scheint die Zell-Zell-Interaktion so alteriert zu sein, daß die SSLc ihre Effektorfunktion nicht mehr ausüben können. Wie bei verschiedenen in vitro-Reaktionen (6,41) wird wahrscheinlich auch hier die Produktion von Lymphokinen durch CyA inhinbiert. ALBERTI (2) und THOMSON (132) konnten diese Wirkung von CyA in Analogie dazu auch an einem Modell der verzögerten Überempfindlichkeits-

...

reaktion nachweisen.
ANDRUS (6) konnte aber ferner in vitro zeigen, daß bei einer hohen CyA-Dosis die Aktivierung von T-Zellen auch im Beisein von Interleukinen unterbunden ist. CyA verringert also vermutlich auch die Empfindlichkeit von Lymphozyten gegenüber der Wirkung von Lymphokinen. In Analogie dazu ist es daher denkbar, daß CyA auch die Ansprechbarkeit der i.v.-injizierten Lymphozyten gegenüber dem durch SSLc ausgelösten Zellrekrutierungseffekt vermindert. Welchen Effekt das CyA in dem hier beschriebenen Modell ausübt, kann derzeit noch nicht eindeutig gezeigt werden.

4.3. Einfluss von allogenen Zellen bei der Restimulation der SSLc

Wie aus den Untersuchungen von 3.1.8. zu entnehmen, haben SSLc per se keine Rekrutierungskapazität. Dies deutet nochmals darauf hin, daß eine Interaktion mit den allogenen Zellen eine wichtige Voraussetzung für die Auslösung der zellulären Infiltration ist. Dabei steigt der Rekrutierungsindex mit der Anzahl an allogenen Zellen im Transplantat. Entscheidend ist dabei wohl auch hier, daß die Frequenz der Zell-Zell-Interaktionen dadurch zunimmt. In Analogie dazu sind auch Reaktionen der verzögerten Überempfindlichkeit abhängig von der Antigendosis (47,88).
Mehrere Autoren (87,103,125) haben Hinweise dafür gefunden, daß die Immunogenität von verschiedenen Organen und Zellen ganz unterschiedlich ist. Im Gegensatz dazu konnte aber für das Schwamm-Matrix-Modell gezeigt werden (3.1.5.), daß die Restimulation von SSLc mit verschiedenen lymphoiden Zellen in jedem Fall zu einer vermehrten lymphozytären Infiltration führt. Dies kann daran liegen, daß die SSLc-Population zahlreiche Klone unterschiedlicher Spezifität enthält und daher durch die verschiedenen lymphoiden Zellpopulationen jeweils andere SSLc-Klone restimuliert werden. Genauso

...

ist es möglich, daß die Antigene, die zur Restimulation der SSLc notwendig sind, von allen getesteten lymphoiden Zellpopulationen exprimiert werden.

Ebenso wie Transplantate massiv infiltriert werden (99,127,144), erfolgt auch eine starke Infiltration am Ort des Antigens bei der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (88). Wie unter 3.6. dargelegt, ist die lymphozytäre Infiltration teilweise gekoppelt mit einem Anstieg der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung. In Analogie dazu ist auch eine Veränderung der beiden Parameter für die Reaktion der verzögerten Überempfindlichkeit beschrieben worden (62,93).

In diesem und dem vorherigen Abschnitt ist mehrfach auf Übereinstimmungen zwischen der Reaktion vom verzögerten Überempfindlichkeitstyp und der zellulären Abstoßungsreaktion von Transplantaten hingewiesen worden. In beiden Fällen kommt es zu einer massiven mononukleären Zellinfiltration am Ort des Antigens. Es ist bekannt, daß SSLc bei beiden Immunreaktionen bevorzugt zum spezifischen Antigen bzw. in das spezifische Allotransplantat wandern. In beiden Testsystemen ist außerdem die lokale Zellinfiltration nach Bestrahlung der SSLc nicht unterbunden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit und in den angeführten Literaturstellen zeigen weitere Analogien zwischen der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion und der zellulären Abstoßungsreaktion auf. Zum ersten ist übereinstimmend die Intensität des Zellrekrutierungseffektes von der Anzahl der SSLc als auch von der Menge an Antigen bzw. der Anzahl an spezifischen Targetzellen abhängig. Bei beiden Reaktionen findet zu bestimmten Zeiten eine Veränderung der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung statt. In beiden Testsystemen hat CyA einen suppressiven Effekt. Es liegt daher der Schluß nahe, daß die Effektorzellen, die in den zugrunde liegenden Untersuchungen getestet wurden, zum Typ der verzögerten Überempfindlichkeit gehören. Wie auch von LOVELAND (83,84) vermutet, scheinen demnach die Reaktionen vom Typ der verzögerten Überempfindlichkeit und die Transplantatabstoßung lediglich zwei verschiedene Manifestationen der gleichen Immunantwort zu sein.

...

4.4. Einfluss von allogenen Zellen auf die lymphozytäre Infiltration

Bei der Initiierung der Abstoßungsreaktion von transplantierten Organen wird den Passengerlymphozyten eine große Bedeutung zugeordnet (98,103,141).

Wie aus 3.1.6., 3.1.8. und 3.2.2. zu entnehmen ist, haben allogene Zellen per se die Fähigkeit, Lymphozyten zu rekrutieren. Dementsprechend werden die Allotransplantate signifikant stärker infiltriert als die Isotransplantate. Analog dazu konnten BERGMANN (14) und HÄYRY (64) nachweisen, daß keine Akkumulation von Lymphozyten in Isotransplantaten stattfindet. Dagegen fand PEDERSEN (104) nach 18 bis 24 Stunden eine starke Lymphozytenmigration zum Allotransplantat. CHRISTMAS (32) konnte demonstrieren, daß aus Isotransplantaten isolierte Zellen in vitro keine Effektorfunktion ausüben. Studien zur normalen Lymphozytentransferreaktion haben ebenso gezeigt, daß syngene Zellen keine Antwort hervorrufen können (26,121).

Im Vergleich zur Lymphozytenrekrutierung durch SSLc benötigen allogene Zellen einen relativ langen Zeitraum, um eine Rekrutierung auslösen zu können (3.2.3.). Der früheste Zeitpunkt lag dabei bei 16 Stunden. Dies deutet darauf hin, daß die Initiierungsphase wesentlich länger dauert als bei der spezifischen Interaktion zwischen SSLc und allogenen Zellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis haben Studien zur normalen Lymphozytentransferreaktion und Immun-Lymphozytentransferreaktion geführt (149). Bei der durch allogene Zellen hervorgerufenen Lymphozytenrekrutierung scheint demnach zunächst eine Sensibilisierungsphase abzulaufen, bevor dann eine Zellrekrutierung ausgelöst werden kann.

Die Infiltration in die Allotransplantate ist direkt abhängig von der Anzahl an allogenen Zellen im Transplantat (3.2.4.). Ein Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der dadurch ausgelösten Reaktion ist nicht nur für die normale Lymphozytentransferreaktion

...

(21,26,121), sondern auch für andere Modelle der Graft-versus-Host-Reaktion (10,43,46) beschrieben worden. Durch die erhöhte Anzahl an Zellen im Transplantat kann die Antigen-Rezeptor-Wechselwirkung zunehmen.
Die durch allogene Zellen ausgelöste Infiltration ist eine reine T-Zell-Funktion (3.2.5.), während B-Zellen keine Rekrutierungskapazität aufweisen. Daß T-Zellen auch wichtig für die Auslösung einer Graft-versus-Host-Reaktion sind, haben Messungen an verschiedensten Modellen ergeben (27,37,46,90,100,111).
Aus den Übereinstimmungen zwischen der Lymphozytenrekrutierung in Allotransplantate und den Ergebnissen aus Studien zur Graft-versus-Host-Reaktion ist zu entnehmen, daß es sich bei den hier geführten Untersuchungen um eine Reaktion der lokal injizierten T-Zellen gegen die Empfängerzellen handelt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß allogene Zellen auch in bestrahlten und damit stark immunsupprimierten Mäusen nach 2 Tagen eine starke Rekrutierung zum Allotransplantat hervorrufen (3.4.5.).
Glukokortikoide haben einen inhibierenden Effekt auf die durch SSLc hervorgerufene Lymphozytenrekrutierung in Allotransplantate (68). Aus 3.4.4. geht hervor, daß Dexamethason zusätzlich die vermehrte Lymphozytenrekrutierung zum Allotransplantat, die durch die allogenen T-Zellen ausgelöst wird, verhindern kann. Das könnte bedeuten, daß durch die lympholytische Aktivität der Glukokortikoide (110,128) nur noch eine verminderte Anzahl dieser Zellen im Transplantat ist. Von einigen Autoren (34,54,75,116) ist andererseits eine hemmende Wirkung auf die Sekretion von Lymphokinen beschrieben worden. Auch ein Einfluß auf das Migrationsverhalten zirkulierender Lymphozyten wurde demonstriert (12,39,49).
Durch die lokale Dexamethasongabe wird aber nicht nur die lymphozytäre Infiltration in die Allotransplantate drastisch vermindert, sondern auch der Lymphozyteneinstrom in das Isotransplantat stark reduziert. Dieser Effekt kann auf die unspezifische entzündungshemmende Wirkung der Glukokortikoide zurückgeführt werden. Ein entsprechender unspezifischer Effekt auf die lokale Zellinfiltration wurde früher schon mehrfach beschrieben (20,33,52).

...

Die hervorragende Wirkung von CyA als immunsuppressives Agens bei der Knochenmarkstransplantation konnte in Tiermodellen von BEKKUM (13) und TUTSCHKA (138) nachgewiesen werden. Diese Autoren haben auf die Funktionstüchtigkeit des Transplantates ohne die Folgen einer Graft-versus-Host-Erkrankung hingewiesen. Andere Autoren (89, 131) fanden ebenfalls eine Verminderung der Graft-versus-Host Reaktion in einem anderen Versuchsmodell.
Aus den Untersuchungen von 3.4.3. geht hervor, daß CyA die durch allogene T-Zellen ausgelöste zelluläre Infiltration unterbinden kann. Wie schon oben erwähnt, nimmt das CyA dabei wahrscheinlich Einfluß auf die Lymphokinsekrektion der allogenen Zellen. Dabei scheint im Gegensatz zu Dexamethason eine isolierte spezifische Wirkung auf die zelluläre Immunreaktion vorzuliegen, denn die Infiltration in die Isotransplantate ist durch CyA nicht beeinträchtigt. Somit kann ein anti-entzündlicher Effekt ausgeschlossen werden. Hinweise dafür liegen auch von anderen Arbeitsgruppen (96,117) vor. Interessanterweise haben diese Untersuchungen ergeben, daß eine Applikation von CyA 16 Stunden nach lokaler Zellinjektion auch zu einer Verminderung der Zellrekrutierung in das Allotransplantat führt. Demnach hat CyA zum einen einen suppressiven Effekt zu Beginn einer Immunantwort, zusätzlich kann durch dieses Agens aber auch eine bereits begonnene Immunreaktion vermindert werden.
Bestrahlung hat auf Lymphozyten einen unterschiedlichen Effekt. Aktivierte Lymphozyten sind nach Bestrahlung noch zu einer Freisetzung von löslichen Faktoren fähig (48,55,146). Sie können auch noch eine Reaktion der verzögerten Überempfindlichkeit auslösen (50,77,140) und zu einer durch SSLc ausgelösten Lymphozytenrekrutierung in Schwamm-Matrix-Allotransplantate führen (68). Dahingegen ist mehrfach beschrieben worden, daß kleine Lymphozyten strahlensensibler sind (97,126). So konnten bestrahlte kleine Lymphozyten kaum eine Graft-versus-Host-Reaktion auslösen (121,126). Dementsprechend konnte in den hier geführten Untersuchungen (3.3.2.) gezeigt werden, daß die Bestrahlung von allogenen Milzzellen, die zum größten Teil nichtsensibilisierte kleine Lymphozyten sind, zu einem völligen Ver-

...

schwinden der Lymphozytenrekrutierung in die Allotransplantate führt. Dagegen ist die Zellrekrutierung durch bestrahlte ConA-induzierte T-Lymphoblasten nur vermindert. Dies erklärt sich vermutlich mit der Tatsache, daß die an der Zellteilung gehemmten Lymphoblasten noch zu einer Sekretion von Lymphokinen fähig sind. In Analogie dazu konnte WARD (139) zeigen, daß bei einer lokalen Graft-versus-Host-Reaktion ein für Monozyten chemotaktisch wirkender Faktor freigesetzt wird und die Freisetzung dieses Faktors vor der Proliferation der Zellen stattfindet. Proliferation ist demnach keine Bedingung für die Rekrutierungskapazität von Zellen. In anderen Modellen zur Messung der Graft-versus-Host-Reaktion konnten mehrere Autoren (21,46) ebenfalls nachweisen, daß die Entwicklung dieser Reaktion durch eine Bestrahlung der allogenen Zellen nicht unterbunden wird.

Mitomycin C-Behandlung hat sowohl in vivo als auch in vitro keinen Effekt auf die Freisetzung von Faktoren (48,112). Das führt wie bei Bestrahlung dazu, daß behandelte allogene T-Lymphoblasten nach 24 Stunden noch zu einer Rekrutierung von Lymphozyten fähig sind (3.3.3.). Dieser Effekt ist jedoch nach 48 Stunden unterbunden. Die Verminderung bzw. das völlige Verschwinden der Lymphozytenrekrutierung nach einer anti-proliferativen Behandlung der allogenen Zellen dürfte demnach auf den Zelltod in der Mitose zurückzuführen sein (126).

Mit den hier dargelegten Untersuchungen kann damit eindeutig gezeigt werden, daß Passenger-T-Lymphozyten, wenn sie in einer genügend großen Anzahl im transplantierten Gewebe vorhanden sind, eine lokale Graft-versus-Host-Reaktion auslösen, die zu einer starken Stimulierung des Lymphozyteneinstroms in ein Allotransplantat führt. Dieser Zellrekrutierungsmechanismus in der Frühphase nach Transplantation eines Allotransplantates ist offensichtlich zumindest z. T. unabhängig von einer Proliferation der Passenger-T-Lymphozyten.

...

4.5. Mechanismen der erhöhten Zellrekrutierung

LINDQUIST (81) konnte demonstrieren, daß bei der Abstoßung eines Nierenallotransplantates eine Gefäßpermeabilitätserhöhung für Serumproteine besteht. Andere Autoren (9,120) wiesen darauf hin, daß vasoaktive Amine die Akkumulation von Zellen bei der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion beeinflussen. Dieser Mechanismus erlaubt die Passage von nicht-rezirkulierenden Zellen durch Endothelzellen (53).
In dem Schwamm-Matrix-Modell scheint eine erhöhte Gefäßpermeabilität zumindest nicht allein für die zelluläre Infiltration verantwortlich zu sein, denn die Infiltration setzt zeitlich schon vor der Veränderung der Gefäßpermeabilität ein (3.1.3. und 3.6.2.). Genauso konnte bei einer geringen Anzahl an SSLc im Transplantat eine erhöhte zelluläre Infiltration nachgewiesen werden (3.1.4.), während die Gefäßpermeabilität noch unbeeinflußt war (3.6.3.). Analog dazu konnte ROSE (113) in einem Modell der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion nachweisen, daß die Gefäßpermeabilitätserhöhung und die Lymphoblastenextravasation unabhängig voneinander sind. Ähnliche Hinweise gaben auch andere Autoren (119,142).
HAY (62) und OTTAWAY (101) wiesen nach, daß eine Abhängigkeit zwischen der lokalen Durchblutung und der Zellakkumulation besteht. Aus den hier geführten Untersuchungen (3.1.3. und 3.6.2.) wird aber deutlich, daß eine Erhöhung der lokalen Durchblutung genau wie die Gefäßpermeabilität keine Bedingung für die Zellrekrutierung ist. HANTO (60) und HOPT (70) sind bei ähnlichen Untersuchungen zur gleichen Schlußfolgerung gekommen.
Neben einer Veränderung der lokalen Durchblutung und Gefäßpermeabilität müssen also andere Mechanismen existieren, die eine Lymphozytenakkumulation im Transplantat hervorrufen können. Wie oben schon erwähnt, wird Lymphokinen dabei eine große Bedeutung zugeordnet. Für die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion ist gezeigt worden, daß SSLc nach Restimulation mit dem spezifischen Antigen Lymphokine

...

sezernieren (86,148). Mehrere Autoren (42,76,106) haben gezeigt, daß ein einzelner T-Zell-Klon verschiedene Faktoren sezernieren kann, andererseits aber ein und dasselbe Lymphokin sowohl von Lyt-1^+ als auch von Lyt-2^+ T-Zell-Klonen gebildet werden kann. Das macht nochmals deutlich, daß verschiedene T-Zell-Subpopulationen bei der Ausbildung einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion involviert sein können. Bei der Entwicklung der Reaktion vom verzögerten Überempfindlichkeitstyp und der Graft-versus-Host-Reaktion sind vor allem ein auf Makrophagen chemotaktisch wirkender Faktor (MCF) und ein auf die Makrophagenmigration inhibierend wirkender Faktor (MIF) beschrieben worden (86,139). Durch diese beiden Faktoren ist gewährleistet, daß die Makrophagen, die durch Chemotaxis angezogen worden sind, an dem Ort der Entzündungsreaktion festgehalten werden (1,124).

Weniger untersucht sind hingegen die Lymphokine, die auf die Migration von Lymphozyten wirken. PARROTT (102) hat nachgewiesen, daß T-Zellen zur Lokomotion fähig sind. Andere Autoren (29,61,66) konnten zeigen, daß auch Lymphozyten auf bestimmte chemotaktische Stimuli reagieren. In vitro wurde außerdem ein auf die Lymphozyten immobilisierend wirkender Faktor nachgewiesen (40,78,109). Dementsprechend konnte auch in vivo eine Akkumulation von Lymphozyten bei der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion demonstriert werden (36). HOFFMAN (66) schließlich konnte zeigen, daß Gewebsflüssigkeit aus Schwamm-Matrix-Allotransplantaten chemokinetisch auf Lymphozyten in vitro wirkt. Damit scheint die Makrophagen- und Lymphozytenakkumulation auf einem ähnlichen Mechanismus zu beruhen.

Somit liegt nahe, daß die lymphozytäre Infiltration in Allotransplantate über verschiedene Faktoren gesteuert wird. Allogene Passenger-T-Zellen, die sich im Transplantat befinden und die dem Typ der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion angehören, sezernieren Lymphokine, die zu einer Akkumulation von anderen Lymphozyten führen. Zum Zeitpunkt der Abstoßungsreaktion führen die SSLc, die sich dann in großer Anzahl im Transplantat befinden, über eine entsprechende Lymphokinsekretion zu einer massiven Steigerung der

...

lymphozytären Infiltration. Möglicherweise spielt dabei die gleichzeitige Erhöhung der lokalen Gefäßpermeabilität und Durchblutung eine wesentliche Rolle.

4.6. Klinische Relevanz der Untersuchungen

Für Lympokine ist in vitro (28,51) und in vivo (137) auch eine Wirkung auf xenogene Zellen beschrieben worden. In vivo konnte für xenogene Zellen zusätzlich Graft-versus-Host-Aktivität nachgewiesen werden (27,72,107,129).
Die Untersuchungen aus 3.5.4. haben ergeben, daß sowohl humane PBL (vorwiegend kleine Lymphozyten) als auch humane aktivierte Lymphoblasten zu einer vermehrten Lymphozytenrekrutierung bei Mäusen führen. Da diese Rekrutierung ihren Höhepunkt im Gegensatz zum allogenen System schon nach 8 Stunden (3.5.3.) hat, könnte dieses Modell nach genauerer Prüfung angewendet werden, um die Immunkompetenz von humanen Zellen innerhalb eines kurzen Zeitraumes in vivo zu testen. Dies könnte sowohl für die Transplantationsimmunologie als auch für die Tumorimmunologie von Bedeutung sein, da alle bisher angewendeten in vitro-Testsysteme über einen längeren Zeitraum laufen.
Wie schon oben erwähnt, haben SSLc, die in vivo ein Allotransplantat infiltrieren, die gleiche Fähigkeit, Lymphozyten zu rekrutieren wie die in der gemischten Lymphozytenkultur gebildeten SSLc. Humane SSLc weisen nach Restimulation mit den spezifischen allogenen Zellen einen ähnlichen Rekrutierungseffekt wie die murinen SSLc auf. Daher liegt es nahe, daß die Ergebnisse dieser Arbeit ebenso Aufschluß über die Regulation der zellulären Infiltration in humane Allotransplantate geben.

...

4.7. Regulation der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate

Die bisher in der Literatur veröffentlichten und die hier aufgeführten Ergebnisse geben Aufschluß über die Regulation der lymphozytären Infiltration in Allotransplantate (Abb. 21). Bei dieser Infiltration können 2 Phasen unterschieden werden.
In der ersten Phase erfolgt eine vermehrte Infiltration durch die lokale Graft-versus-Host-Reaktion der transplantierten Passenger-T-Lymphozyten. Die Wirkung dieser Reaktion erfolgt vermutlich durch die Freisetzung von Lymphokinen, die zu einer Rekrutierung von Lymphozyten führt. Diese können sich z. T. direkt im Transplantat zu SSLc entwickeln. Zusätzlich gelangen dadurch voll entwickelte SSLc über den Blutweg vermehrt ins Transplantat.
In der zweiten Phase erfolgt die spezifische Interaktion zwischen SSLc und allogenen Zellen. Durch diese Interaktion werden vermutlich erneut Lymphokine sezerniert, die wiederum zu einem Anstieg der lymphozytären Infiltration mit sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Lymphozyten führen. Zusätzlich wird durch diese Interaktion die lokale Gefäßpermeabilität und Durchblutung erhöht. Durch diesen Mechanismus ist es möglich, daß ständig neu eingewanderte, nicht-sensibilisierte Lymphozyten im Transplantat eine Sensibilisierung erfahren und zusätzlich die Rekrutierung der in lymphatischem Gewebe gebildeten SSLc zu einer Anreicherung dieser Zellen im Transplantat führt. Dies verstärkt die Intensität der Interaktion zwischen SSLc und allogenen Zellen.
Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Mechanismen der Infiltration zu modifizieren. In der ersten Phase kann der Effekt durch Medikamente wie Glukokortikoide und Cyclosporin A, aber auch durch lokale Bestrahlung des Transplantates unterbunden werden. In der zweiten Phase sind die oben genannten Medikamente ebenfalls wirksam, während eine lokale Bestrahlung nur einen Effekt auf die nicht-sensibilisierten Lymphozyten im Transplantat ausübt.

...

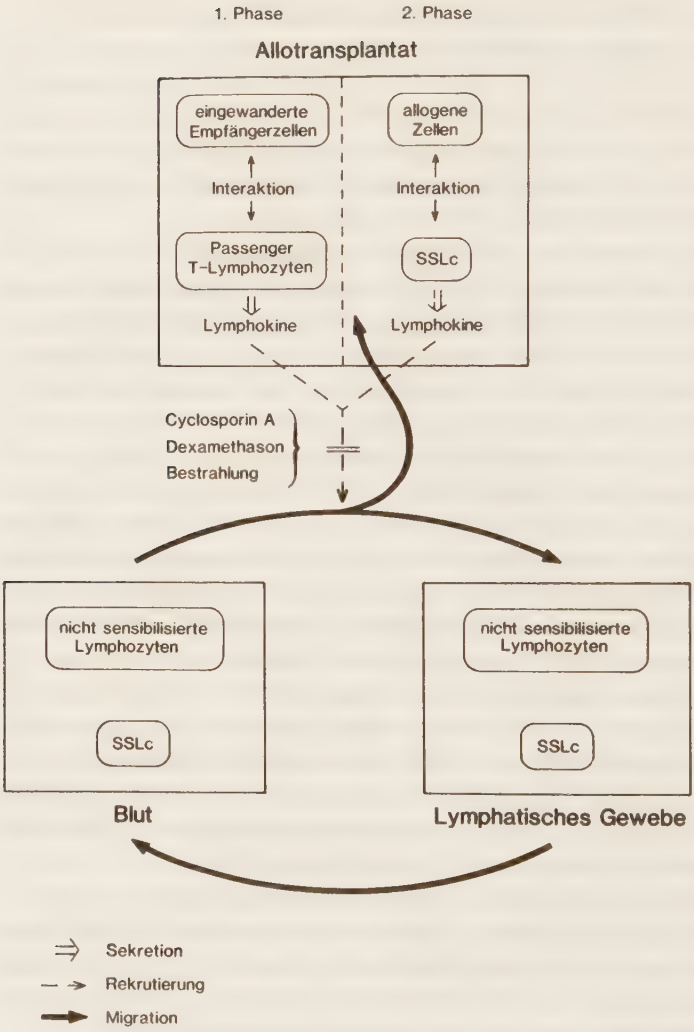

ABB. 21: Arbeitshypothese zur Regulation der lymphozyten Infiltration von Allotransplantaten.

...

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mechanismen der lymphozytären Infiltration von Allotransplantaten wurden im Schwamm-Matrix-Modell untersucht. Je 2 zellfreie Schwamm-Matrix-Stücke wurden BALB-Mäusen subcutan implantiert. Zu bestimmten Zeiten vor Versuchsende wurden unterschiedliche Zellen in die Implantate injiziert, deren Wirkung auf die lymphozytäre Infiltration getestet werden sollte. 17 - 18 Tage nach Implantation war die Schwamm-Matrix vaskularisiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die lymphozytäre Infiltration durch i.v.-Injektion von ^{51}Cr-markierten Milzzellen gemessen. Jedes Versuchstier trug ein experimentelles Transplantat und ein Kontrolltransplantat.

Zwischen SSLc und den spezifischen allogenen Targetzellen findet eine spezifische Interaktion statt. Diese führt zu einer vermehrten lymphozytären Infiltration. Bereits 4 Stunden nach Zellinjektion von SSLc und allogenen Zellen in die Schwamm-Matrix ist eine erhöhte Infiltration in das spezifische Allotransplantat nachweisbar. Das Ausmaß der lymphozytären Infiltration ist sowohl von der Anzahl der SSLc als auch von der Anzahl der allogenen Zellen im Transplantat abhängig. SSLc lassen sich sowohl durch T-Lymphozyten und T-Lymphoblasten als auch durch B-Lymphozyten und B-Lymphoblasten spezifisch restimulieren. Zwischen der zytotoxischen Aktivität der SSLc und der Zellrekrutierungskapazität besteht keine Korrelation. SSLc, die zum größten Teil für die lymphozytäre Infiltration verantwortlich sind, gehören vermutlich dem Typ der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion an. Sie sind nicht nur in der Lage, Lymphozyten zu rekrutieren, sondern erhöhen zum Zeitpunkt der Abstoßungsreaktion auch die lokale Gefäßpermeabilität und Durchblutung.

Allotransplantate werden in den ersten Tagen stärker infiltriert als Isotransplantate. Dieser Effekt kommt unabhängig von einer Immunreaktion des Empfängers zustande. Zeitlich setzt die lympho-

...

zytäre Infiltration in ein Allotransplantat 16 Stunden nach Transplantation ein. Dabei ist ebenfalls die Anzahl der transplantierten allogenen Zellen verantwortlich für die Stärke der lymphozytären Infiltration. Von den transplantierten allogenen Zellen sind aber nur die allogenen T-Zellen in der Lage, die lymphozytäre Infiltration in der Frühphase nach Transplantation zu steigern. Es handelt sich dabei um eine lokale Graft-versus-Host-Reaktion, die aber nur für 4 Tage persistiert. Nach 6 Tagen setzt dann die Host-versus-Graft-Reaktion ein, die ab diesem Zeitpunkt für die Infiltration verantwortlich ist und zur Abstoßung führt.

Nicht aktivierte allogene T-Lymphozyten sind nach Bestrahlung nicht mehr zu einer Rekrutierung von Lymphozyten in der Lage, während die Bestrahlung von allogenen T-Lymphoblasten nicht zu einer Inhibierung der Reaktion führt. Desgleichen sind auch Mitomycin C-behandelte T-Lymphoblasten für einen gewissen Zeitraum noch zu einer Rekrutierung fähig. CyA unterbindet die lymphozytäre Infiltration in Allotransplantate. Dabei hat es sowohl auf die durch allogene T-Zellen als auch auf die durch SSLc nach spezifischer Restimulation ausgelöste Rekrutierung einen suppressiven Effekt. Dexamethason blockiert ebenfalls die Zellrekrutierungskapazität von allogenen T-Zellen.

Die mit in vitro generierten SSLc gefundenen Ergebnisse sind auch für die in vivo-Situation bei einer Abstoßungsreaktion von Bedeutung. SSLc, die aus Allotransplantaten während der Abstoßungsperiode isoliert wurden, haben analoge zellrekrutierende Eigenschaften. Auch humane SSLc weisen nach Restimulation mit dem spezifischen Antigen im xenogenen Mäusesystem eine signifikante Rekrutierungskapazität auf.

Die hier beschriebenen zellulären Immunreaktionen geben Aufschluß über bestimmte Mechanismen, die die lymphozytäre Infiltration eines Allotransplantates in vivo regulieren. Da durch humane SSLc in diesem Modell eine ähnliche lymphozytäre Infiltration ausgelöst wird wie durch murine syngene SSLc, sind die hier beschriebenen

...

Mechanismen vermutlich auch für die massive lymphozytäre Infiltration von Allotransplantaten beim Menschen verantwortlich. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, daß zumindest bei der Transplantation von allogenem lymphoidem Gewebe in den ersten Tagen nach der Transplantation die Infiltration nicht auf einem Zufallsereignis beruht, sondern die allogenen lymphoiden T-Zellen aktiv an der Lymphozytenrekrutierung beteiligt sind. Dadurch erfahren quantitativ mehr Empfängerlymphozyten im Transplantat eine Sensibilisierung. Nach der Entwicklung dieser Empfängerzellen zu SSLc erfolgt durch diese nach Restimulation mit den spezifischen Zellen im Transplantat die weitere Zellrekrutierung. Die massive lymphozytäre Infiltration eines Allotransplantates, die für die zelluläre Abstoßungsreaktion eine Vorbedingung ist, wird also durch zwei verschiedene spezifische Immunreaktionen innerhalb des Transplantates ausgelöst.

...

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adelman, N. E., Ksiazek, J., Yoshida, T., Cohen, S.:
Lymphoid sources of murine migration inhibition factor.
J. Immunol. 124, 825 - 830, 1980

2. Alberti, S., Boraschi, D., Luini, W., Tagliabue, A.:
Effects of in vivo treatments with cyclosporin A on mouse cell-mediated immune responses.
Int. J. Immunopharmac. 3, 357 - 364, 1981

3. Ali, A. T. M. M., Morley, J., Rumjanek, V. M.:
Cyclosporin A inhibits accumulation of lymphocytes within lymph nodes.
Immunology 47, 345 - 349, 1982

4. Allwood, G. G.:
The migratory behavior of T blasts to contact sensitivity reactions in actively and passively sensitized mice.
Immunology, 28, 681 - 692, 1975

5. Alter, B. J., Bach, F. H.:
Lyt phenotypes of responding cells in secondary alloantigen responses.
J. Immunol. 123, 2599 - 2601, 1979

6. Andrus, L., Lafferty, K. J.:
Inhibition of T-cell activity by cyclosporin A.
Scand. J. Immunol. 15, 449 - 458, 1982

7. Ascher, N. L., Ferguson, R. M., Hoffman, R., Simmons, R. L.:
Partial characterization of cytotoxic cells infiltrating sponge matrix allografts.
Transplantation 27, 254 - 259, 1979

...

8. Ascher, N. L., Hoffman, R., Chen, S., Simmons, R. L.:
Specific and nonspecific infiltration of sponge matrix allografts by specifically sensitized cytotoxic lymphocytes.
Cell. Immunol. 52, 38 - 47, 1980

9. Askenase, P. W., Metzler, C. M., Gershon, R. K.:
Localization of leucocytes in sites of delayed-type hypersensitivity and in lymph nodes: Dependence on vasoactive amines.
Immunology 47, 239 - 246, 1982

10. Baines, M. G., Micklem, H. S.:
A method for the quantitation of the localized graft-versus-host response in the mouse by uptake of ^{125}JUdR.
Transplantation 20, 512 - 517, 1975

11. Balch, C. M., Wilson, C. B., Lee, S., Feldman, J. D.:
Thymus-dependent lymphocytes in tissue sections of rejecting rat renal allografts.
J. Exp. Med. 138, 1584 - 1590, 1973

12. Beer, D. J., Center, D. M.:
In vitro corticosteroid modulation of lymphocyte migration.
Cell.Immunol. 55, 381 - 393, 1980

13. Bekkum, D. W. van, Knaan, S., Zurcher, C.:
Effects of cyclosporin A on experimental graft-versus-host disease (GVDH) in rodents.
Transpl. Proc. 12, 278 - 282, 1980

14. Bergmann, S. R., Lerch, R. A., Carlson, E. M., Saffitz, J. E., Sobel, B. E.:
Detection of cardiac transplant rejection with radiolabeled lymphocytes.
Circulation 65, 591 - 599, 1982

...

15. Bordes-Aznar, J., Kupiec-Weglinski, J. W., Duarte, A. J. S., Milford, E. L., Strom, T. B., Tilney, N. L.:
Fuction and migration of suppressor lymphocytes from cyclosporin-treated heart graft recipients.
Transplantation 35, 185 - 190, 1983

16. Borel, J. F.:
Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity.
Immunology 31, 631 - 641, 1976

17. Borel, J. F., Feurer, C., Magnée, C., Stähelin, H.:
Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals.
Immunology 32, 1017 - 1025, 1977

18. Borel, J. F., Meszaros, J.:
Skin transplantation in mice and dogs. Effect of cyclosporin A and dihydrocyclosporin C.
Transplantation 29, 161 - 162, 1980

19. Boucek, R. J., Noble, N. L.:
Connective tissue: A technique for its isolation and study.
Arch. Path. 59, 553 - 558, 1955

20. Boyle, E. A., Mangan, F. R.:
The effect of a novel, nonsteroidal anti-inflammatory compound, nabumetone (BRL 14777), on cellular infiltration into 24 hour polyvinyl sponge implants in the rat, compared with some steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs.
J. Pharm. Pharmacol. 34, 570 - 575, 1982

...

21. Brent, L. Medawar, P.:
Quantitative studies on tissue transplantation immunity.
VII. The normal lymphocyte transfer reaction.
Proc. R. Soc. Lond. 165, 281 - 307, 1966

22. Brondz, B. D., Egorova, S. G., Kotomina, I. F.:
Enrichment of effector T lymphocytes specific to H-2 antigens by elution from allogeneic target cells and characterization of the eluted lymphocyte population.
Eur. J. Immunol. 5, 733 - 741, 1975

23. Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C., Chapuis, B.:
Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.
Immunology 14, 181 - 196, 1968

24. Bunjes, D., Hardt, C., Röllinghoff, M., Wagner, H.:
Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2.
Eur. J. Immunol. 11, 657 - 661, 1981

25. Cantor, H., Boyse, E. A.:
Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly^+ cells in the generation of killer activity.
J. Exp. Med. 141, 1390 - 1399, 1975

26. Carpenter, C. B., Glassock, R. J., Gleason, R., Corson, J. M., Merrill, J. P.:
The application of the normal lymphocyte transfer reaction to histocompatibility testing in man.
J. Clin. Investigation 45, 1452 - 1466, 1966

...

27. Catanzaro, P. J., Graham, R. C., Powell, A. E., Phillips, S. M.:
Characteristics of a xenogeneic lymphocyte transfer reaction: Its use in the study of graft versus host capability of mouse lymphoid cells from various anatomic sites.
Cell Immunol. 22, 140 - 151, 1976

28. Center, D. M., Cruikshank, W.:
Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells.
J. Immunol. 128, 2563 - 2568, 1982

29. Center, D. M.:
Identification of rat mast cell-derived chemoattractant factors for lymphocytes.
J. Allergy Clin. Immunol. 71, 29 - 35, 1983

30. Chang, A. E., Sugarbaker, P. H.:
Preferential homing of passively transferred T cells into skin allografts of mice.
Transplantation 28, 247 - 252, 1979

31. Chang, A. E., Sugarbaker, P. H.:
Assessment of T cell function with a skin allograft assay.
Transplantation 29, 381 - 387, 1980

32. Christmas, S. E., MacPherson, G. G.:
The role of mononuclear phagocytes in cardiac allograft rejection in the rat. I. Ultrastructural and cytochemical features.
Cell. Immunol. 69, 248 - 270, 1982

...

33. Clarke, A. K., Vernon-Roberts, B., Currey, H. L. F.:
Assessment of anti-inflammatory drugs in the rat using subcutaneous implants of polyurethane foam impregnated with dead tubercle bacilli.
Ann. Rheum. Dis. 34, 326 - 331, 1975

34. Cline, M. J., Melmon, K. L.:
Plasma kinins and cortisol: A possible explanation on the anti-inflammatory action of cortisol.
Science 153, 1135 - 1138, 1966

35. Cohen, I. R.:
The recruitment of specific effector lymphocytes by antigen-reactive lymphocytes in cell-mediated autosensitization and allosensitization reactions.
Cell. Immunol. 8, 209 - 220, 1973

36. Cohen, S., Ward, P. A., Yoshida, T., Burek, C. L.:
Biologic activity of extracts of delayed hypersensitivity skin reaction sites.
Cell. Immunol. 9, 363 - 376, 1973

37. Cole, G. J., Morris, B.:
The normal lymphocyte transfer reaction in lambs thymectomized in utero.
Aust.J. Exp. Biol. Med. Sci. 49, 89 - 99, 1971

38. Corley, R. B., Kindred, B.:
In vivo responses of alloreactive lymphocytes stimulated in vivo.
Scand. J. Immunol. 6, 991 - 996, 1977

39. Cox, J., Ford, W. L.:
The migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium. IV. Prednisolone acts at several points on the recirculation pathways of lymphocytes.
Cell. Immunol. 66, 407 - 422, 1982

...

40. Cruikshank, W., Center, D. M.:
Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines.
II. Purification of a lymphotactic factor (LCF).
J. Immunol. 128, 2569 - 2574, 1982

41. Dos Reis, G. A., Shevach, E. M.:
Effect of cyclosporin A on T cell function in vitro: The mechanism of suppression on T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell.
J. Immunol. 129, 2360 - 2367, 1982

42. Ely, J. M., Prystowsky, M. B., Eisenberg, L., Quintans, J., Goldwasser, E., Glasebrook, A. L., Fitch, F. W.:
Alloreactive cloned T cell lines. V. Differential kinetics of IL 2, CSF and BCSF release by a cloned T amplifier cell and its variant.
J. Immunol. 127, 2345 - 2349, 1981

43. Elkins, W. L.:
Specific and nonspecific lymphoid cell proliferation in the pathogenesis of graft-versus-host reactions.
Transplantation 9, 273 - 302, 1970

44. Emeson, E. E.:
Migratory behavior of lymphocytes with specific reactivitiy to alloantigens. I. Selective recruitment to spleen, bone marrow, and liver after an intravenous challenge.
J. Immunol. 119, 1204 - 1212, 1977

45. Emeson, E. E.:
Migratory behavior of lymphocytes with specific reactivity to alloantigens. II. Selective recruitment to lymphoid cell allografts and their draining lymph nodes.
J. Exp. Med. 147, 13 - 24, 1978

...

46. Emeson, E. E., Thursh, D. R.:
Mechanism of graft-versus-host-induced lymphadenopathy in mice. Trapping vs. proliferation.
J. Exp. Med. 137, 1293 - 1302, 1973

47. Ertl, H. C. J.:
Adoptive transfer to delayed-type hypersensitivity to Sendai virus. I. Induction of two different subsets of T lymphocytes which differ in H-2 restriction as well as in the Lyt phenotype.
Cell. Immunol. 62, 38 - 49, 1981

48. Eshhar, Z., Armerding, D., Waks, T., Katz, D. H.:
Activation of T and B lymphocytes in vitro. V. Cellular locus, metabolism and genetics of induction, and production of the allogeneic effect factor.
J. Immunol. 119, 1457 - 1467, 1977

49. Fauci, A. S.:
Mechanisms of the immunosuppressive and anti-inflammatory effects of glucocorticosteroids.
J. Immunopharmacol. 1, 1 - 25, 1978 - 1979

50. Feldman, J. D.:
The role of proliferation in delayed hypersensitivity.
J. Immunol. 101, 563 - 571, 1968

51. Fidler, I. J.:
Activation in vitro of mouse macrophages by syngeneic, allogeneic or xenogeneic lymphocyte supernatants.
J. Nat. Canc. Inst. 55, 1159 - 1163, 1975

52. Ford-Hutchinson, A. W., Walker, J. R., Smith, M. J. H.:
Assessment of anti-inflammatory activity by sponge implantation techniques.
J. Pharmacol. Methods 1, 3 - 7, 1978

...

53. Gershon, R. K., Askenase, P. W., Gershon, M. D.:
Requirement for vasoactive amines for production of delayed-type hypersensitivity skin reactions.
J. Exp. Med. 142, 732 - 747, 1975

54. Gillis, S., Crabtree, G. R., Smith, K. A.:
Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation.
J. Immunol. 123, 1624 - 1631, 1979

55. Gorski, A. J., Dupont, B., Hansen, J. A., Good, R. A.:
Leucocyte migration inhibitory factor (LMIF) production in unidirectional mixed lymphocyte cultures.
J. Immunol. 117, 865 - 870, 1976

56. Grindley, J. H., Waugh, J. M.:
Plastic sponge which acts as a framework for living tissue.
Arch. Surg. 63, 288 - 297, 1951

57. Hall, J. G.:
Studies of the cells in the afferent and efferent lymph of lymph node draining the site of skin homografts.
J. Exp. Med. 125, 737 - 754, 1967

58. Hall, B. M., Dorsch, S., Roser, B.:
The cellular basis of allograft rejection in vivo. I. The cellular requirements for first-set rejection of heart grafts.
J. Exp. Med. 148, 878 - 889, 1978

59. Hamburger, J., Dimitriu, A., Bankir, L., Debray-Sachs, M., Auvert, J.:
Collection of lymph from kidneys homotransplanted in man: Cell transformation in vivo.
Nature 232, 633 - 634, 1971

...

60. Hanto, D. W., Hopt, U. T., Hoffman, R., Simmons, R. L.:
Lymphocyte recruitment, regional blood flow and vascular permeability at sites of allogeneic cellular interactions.
J. Immunol. 129, 2437 - 2443, 1982

61. Harita, S., Shimokawa, Y., Hayashi, H.:
Production of two lymphocyte chemotactic factors by antigen-stimulated guinea pig lymphocytes.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 70, 118 - 123, 1983

62. Hay, J. B., Hobbs, B. B.:
The flow of blood to lymph nodes and its relation to lymphocyte traffic and the immune response.
J. Exp. Med. 145, 31 - 44, 1977

63. Häyry, P.:
Anamnestic responses in mixed lymphocyte culture-induced cytolysis (MLC-CML) reaction.
Immunogenetics 3, 417 - 453, 1976

64. Häyry, P., Willebrandt, E. von, Soots, A.:
In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection. III. Kinetics of the inflammatory response and generation of donor-directed killer cells.
Scand. J. Immunol. 10, 95 - 108, 1979

65. Hess, A. D., Donnenberg, A. D., Tutschka, P. J., Santos, G. W.:
Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. V. Analysis of responding T lymphocyte subpopulations in primary MLR with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 130, 717 - 721, 1983

...

66. Hoffman, R., Ascher, N. L., Simmons, R. L.:
In vitro chemotaxis of lymphocytes to fluid factors in rejecting allografts. In: Molecular basis of immune cell function, 13th International Leucocyte Culture Conference. ed. Kaplan, J. G., Elsevier, Amsterdam, S. 545 - 548, 1979

67. Hopt, U. T., Sullivan, W., Hoffman, R., Simmons, R. L.:
Migration and cell recruiting activity of specifically sensitized lymphocytes in sponge matrix allografts.
Transplantation, 30, 411 - 416, 1980

68. Hopt, U. T., Sullivan, W., Simmons, R. L.:
Recruitment of lymphocytes to sponge matrix allografts.
Transpl. Proc. 13, 1086 - 1090, 1981

69. Hopt, U. T., Bockhorn, H., Müller, G. H., Müller, G. E., Simmons, R. L.:
Regulation der lymphozytären Infiltration von Schwamm-Matrix-Allotransplantaten.
Langenbecks Arch. Chir. Forum (Suppl.), 181 - 185, 1981

70. Hopt, U. T., Bockhorn, H., Müller, G. H., Thiede, K., Simmons, R. L.:
Lymphocyte-recruiting capacity of cells infiltrating rejecting sponge matrix allografts in vivo.
Transpl. Proc. 15, 367 - 370, 1983.

71. Jakôbisiak, M.:
Quantitative data concerning the development of the cellular infiltration of skin allograft in mice.
Transplantation, 12, 364 - 367, 1971

72. Jones, M. A. S., Lafferty, K. J.:
Characteristics of lymphocyte transfer reactions produced in sheep.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47, 159 - 169, 1969

...

73. Julius, M. H., Simpson, E., Herzenberg, L. A.:
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645 - 649, 1973

74. Jungi, T. W., McGregor, D. D.:
Activated lymphocytes trigger lymphoblast extravasation.
Cell. Immunol. 38, 76 - 83, 1978

75. Kantrowitz, F., Robinson, D. R., McGuire, M. B.:
Corticosteroids inhibit prostaglandin production by rheumatoid synovia.
Nature 258, 737 - 739, 1975

76. Kelso, A., Glasebrook, A. L., Kanagawa, O., Brunner, K. T.:
Production of macrophage-activating factor by T lymphocyte clones and correlation with other lymphokine activities.
J. Immunol. 129, 550 - 556, 1982

77. Kettman, J., Mathews, M. C.:
Radioresistance of cells responsible for delayed hypersensitivity reactions in the mouse.
J. Immunol. 115, 606 - 608, 1975

78. Kowalczyk, D., Zembala, M., Litwora, E.:
The in vitro inhibition of migration of mouse spleen T lymphocytes. I. The response of sensitized T cells to specific antigen and of normal T cells to lymphokines.
Cell Immunol. 57, 361 - 369, 1981

79. Leighton, J.:
A sponge matrix method for tissue culture. Formation of organized aggregates of cells in vitro.
J. Nat. Canc. Inst. 12, 545 - 551, 1951

...

80. Leung, K. N., Ada, G. L.:
Two T-cell populations mediate delayed-type hypersensitivity to murine influenca virus infection.
Scand. J. Immunol. 12, 481 - 487, 1980

81. Lindquist, R. R., Guttmann, R. D., Merrill, J. P., Dammin, G. J.:
Human renal allografts: Interpretation of morphologic and immunohistochemical observations.
Am. J. Pathol. 53, 851 - 881, 1968

82. Livnat, S., Cohen, I. R.:
Recruitment of effector lymphocytes by initiator lymphocytes. In vivo migration of in vitro sensitized initiator T lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 5, 389 - 394, 1975

83. Loveland, B. E., Hogarth, P. M., Ceredig, Rh., McKenzie, I.F.C.:
Cells mediating graft rejection in the mouse. I. Lyt 1 cells mediate skin graft rejection.
J. Exp. Med. 153, 1044 - 1057, 1981

84. Loveland, B. E., McKenzie, I. F. C.:
Delayed-type hypersensitivity and allograft rejection in the mouse: Correlation of effector cell phenotype.
Immunology 46, 313 - 320, 1982

85. Loveland, B. E., McKenzie, I. F. C.:
Which cells cause graft rejection?
Transplantation 33, 217 - 221, 1982

86. Maarsseveen, A. C. M. Th. van, Bomhof, G., Scheper, R. J.:
Demonstration of accelerated and increased migration inhibition factor release in vivo in a PPD retest reaction.
Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 67, 1 - 6, 1982

...

87. Maizel, S. E., Vallera, D. A., Mentzer, S. J., Ferguson, R. M.:
The relative immunogenicity of murine tissues in vivo.
Curr. Surg. 37, 435 - 438, 1980

88. Marchal, G., Seman, M., Milon, G., Truffa-Bachi, P., Zilberfarb, V.:
Local adopitve transfer of skin delayed-type hypersensitivity initiated by a single T lymphocyte.
J. Immunol. 129, 954 - 958, 1982

89. Markwick, J. R., Hobbs, J. R., Chambers, J. D., Pegrum, G. D.:
Timing of cyclosporin A therapy for abrogation of HVG and GVH responses in rats.
Lancet II_2, 1037 - 1039, 1979

90. Mason, D. W.:
Subpopulations of T cells in the rat that mediate graft-versus-host reactions and lethal graft-versus-host disease.
Adv. Exp. Med. Biol. 149, 545 - 551, 1982

91. Medawar, P. B.:
The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits.
J. Anat. 78, 176 - 199, 1944

92. Moore, A. R., Hall, J. G.:
Nonspecific entry of theracic duct immunoblasts into intradermal foci of antigens.
Cell. Immunol. 8, 112 - 119, 1973

93. Morley, J., Williams, T. J., Slater, A. J., Cubitt, D., Dumonde, D. C.:
Simultaneous measurements of the accumulation of isotope-labelled protein and erythrocytes in skin reactions of allergic inflammation in the guinea pig.
Immunology 23, 113 - 135, 1972

...

94. Neefe, J. R., Sachs, D. H.:
Specific elimination of cytotoxic effector cells. I. Adsorptive behavior of effectors and their precursors on spleen cell monolayers.
J. Exp. Med. 144, 996 - 1008, 1976

95. Nemlander, A., Soots, A., Willebrand, E. von, Häyry, P.:
Redistribution of rat renal allograft-responding leu ocytes during rejection.
Cell. Immunol. 70, 55 - 64, 1982

96. Nemlander, A., Ahonen, J., Wiktorowicz, K., Willebrand, E. von, Hekali, R., Lalla, M., Häyry, P.:
Effect of cyclosporine on wound healing. An analysis with viscous cellulose sponges.
Transplantation 36, 1 - 6, 1983

97. Nichols, W. S., Troup, G. M., Anderson, R. E.:
Radiosensitivity of sensitized and nonsensitized human lymphocytes evaluated in vitro.
Am. J. Pathol. 79, 499 - 507, 1975

98. Oluwole, S., Hardy, M. A., Wang, T., Satake, K., Todd, G., Reemtsma, K., Nowygrod, R.:
Donor pretreatment: rat heart allograft survival and measurement of passenger leucocyte depletion with indium-111.
Transplantation 30, 31 - 33, 1980

99. Oluwole, S., Wang, T., Fawwaz, R., Satake, K., Nowygrod, R., Reemtsma, K., Hardy, M. A.:
Use of indium-111 labeled cells in measurement of cellular dynamics of experimental cardiac allograft rejection.
Transplantation 31, 51 - 55, 1981

...

100. Onoé, K., Yasumizi, R., Oh-Ishi, T., Kakinuma, M., Good, R. A., Fernandes, G., Morikawa, K.:
Specific elimination of the T lineage cells: effect of in vitro treatment with anti-Thy 1 serum without complement on the adoptive cell transfer system.
J. Immunol. Meth. 49, 315 - 322, 1982

101. Ottaway, C. A., Parrott, D. M. V.:
Regional blood flow and its relationship to lymphocyte and lymphoblast traffic during a primary immune reaction.
J. Exp. Med. 150, 218 - 230, 1979

102. Parrott, D. M. V., Good, R. A., O'Neill, G. J., Gupta, S.:
Heterogeneity of locomotion in human T cell subsets.
Proc. Natl. Acad. Sci, USA 75, 2392 - 2395, 1978

103. Parthenais, E., Soots, A., Nemlander, A., Willebrand, E. von, Häyry, P.:
Immunogenicity of allograft components. II. Relative immunogenicity of rat kidney parenchymal versus "passenger" cells.
Cell. Immunol. 57, 92 - 98, 1981

104. Pedersen, N. C., Morris, B.:
The role of the lymphatic system in the rejection of homografts: A study of lymph from renal transplants.
J. Exp. Med. 131, 936 - 969, 1970

105. Prendergast, R. A.:
Cellular specificity in the homograft reaction.
J. Exp. Med. 119, 377 - 387, 1964.

...

106. Prystowski, M. B., Ely, J. M., Beller, D. I., Eisenberg, L., Goldman, J., Goldman, M., Goldwasser, E., Ihle, J., Quintans, J., Remold, H., Vogel, S. M., Fitch, F. W.:
Alloreactive cloned T cell lines. VI. Multiple lymphokine activities secreted by helper and cytolytic cloned T lymphocytes.
J. Immunol. 129, 2337 - 2344, 1982

107. Rees, J. A., Symes, M. O.:
An in vivo test for the immunocompetence of human lymphocytes.
Transplantation 16, 565 - 569, 1973

108. Roberts, P. J., Häyry, P.:
Sponge matrix allografts. A model for analysis of killer cells infiltrating mouse allografts.
Transplantation 21, 437 - 445, 1976

109. Rocklin, R. E.:
Products of activated lymphocytes: Leucocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF).
J. Immunol. 112, 1461 - 1466, 1974

110. Rogers, P., Matossian-Rogers, A.:
Differential sensitivity of lymphocyte subsets to corticosteroid treatment.
Immunology 46, 841 - 848, 1982

111. Rolstad, B., Ford, W. L.:
Immune responses of rats deficient in thymus-derived lymphocytes to strong transplantation antigens (Ag-B). Graft-versus-host activity,allograft rejection and the factor of immunization.
Transplantation 17, 405 - 415, 1974

112. Rolstad, B., Toogood, E.:
Toxicity of $Na_2\ ^{51}CrO_4$ when used to label rat lymphocytes.
J. Immunol. Meth. 21, 271 - 276, 1978

...

113. Rose, M. L., Parrott, D. M. V.:
Vascular permeability and lymphoblast extravasation into inflamed skin are not related.
Cell. Immunol. 33, 62 - 71, 1977

114. Rosenstein, M., Eberlein, T., Kemeny, M. M., Sugarbaker, P. H., Rosenberg, S. A.:
In vitro growth of murine T cells. VI. Accelerated skin graft rejection caused by adoptively transferred cells expanded in T cell growth factor.
J. Immunol. 127, 566 - 571, 1981

115. Rouse, B. T., Wagner, H.:
The in vivo activity of in vitro immunized mouse thymocytes. II. Rejection of skin allografts and graft-versus-host activity.
J. Immunol. 109, 1282 - 1289, 1972

116. Rühl, H., Vogt, W., Bochert, G., Schmidt, S., Moelle, R., Schaoua, H.:
Effect of L-asparaginase and hydrocortisone on human lymphocyte transformation and production of a mononuclear leucocyte chemotactic factor in vitro.
Immunology 26, 989 - 994, 1974

117. Rumjanek, V. M., Smith, L. A., Morley, J.:
Cyclosporin A - a prerecruitment action in the cutaneous response?
Immunol. Letters 6, 69 - 72, 1983

118. Russell, R. J., Wilkinson, P. C., Sless, F., Parrott, D. M. V.:
Chemotaxis of lymphoblasts.
Nature 256, 646 - 648, 1975

...

119. Sabbadini, E., Neri, A., Sehon, A. H.:
Localization of nonimmune radioactively labelled cells in the lesions of contact sensitivity in mice.
J. Immunol. Methods 5, 9 - 19, 1974

120. Schwarzt, A., Askenase, P. W., Gershon, R. K.:
The effect of locally injected vasoactive amines on the elicitation of delayed-typehypersensitivity.
J. Immunol. 118, 159 - 165, 1977

121. Sidky, Y. A., Auerbach, R.:
Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-versus-host reaction.
J. Exp. Med. 141, 1084 - 1100, 1975

122. Smith, F., Miller, J. F. A. P.:
Delayed-type hypersensitivity to allogeneic cells in mice:
I. Requirement for optimal sensitization and definition of the response.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 58, 285 - 294, 1979

123. Smith, F., Miller, J. F. A. P.:
Delayed-type hypersensitivity to allogeneic cells in mice:
II. Cell transfer studies.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 58, 295 - 301, 1979

124. Snyderman, R., Meadows, L., Amos, D. B.:
Characterization of human chemotactic lymphokine production induced by mitogens and mixed leucocyte reactions using a new microassay.
Cell. Immunol. 30, 225 - 235, 1977

125. Soots, A., Parthenais, E., Nemlander, A., Häyry, P.:
Immunogenicity of allograft components. I. Assay for immunogenicity.
Cell. Immunol. 57, 85 - 91, 1981

...

126. Sprent, J., Anderson, R. E., Miller, J. F. A. P.:
Radiosensitivity of T and B lymphocytes. II. Effect of irradiation on response of T cells to alloantigens.
Eur. J. Immunol. 4, 204 - 210, 1974

127. Strom, T. B., Tilney, N. L., Paradysz, J. M., Bancewicz, J., Carpenter, C. B.:
Cellular components of allograft rejection. Identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts.
J. Immunol. 118, 2020 - 2026, 1977

128. Stuart, J. J., Ingram, M.:
The effect of cortisol on viability and glucose uptake in rat thymocytes in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, 1146 - 1150, 1971

129. Talpaz, M., Kim, E., Guardini, M., Sun, Y., Wong, W., Kasi, L., Mavligit, G.:
Objective evaluation of local xenogeneic graft-versus-host reaction by computerized radioisotope imaging (CRI).
J. Immunol. Meth. 61, 133 - 139, 1983

130. Tamura, S. I., Kojima, A., Egashira, Y.:
Correlation between production of inflammatory substances and generation of effector T cells mediating delayed-type hypersensitivity in mice.
Microbiol. Immunol. 25, 693 - 704, 1981

131. Thomson, A. W., Whiting, P. H., Cameron, I. D., Lessels, S. E., Simpson, J. G.:
A toxicological study in rats receiving immunotherapeutic doses of cyclosporin A.
Transplantation 31, 121 - 124, 1981

...

132. Thomson, A. W., Moon, D. K., Geczy, C. L., Nelson, D. S.:
Cyclosporin A inhibits lymphokine production but not the responses of macrophages to lymphokines.
Immunology 48, 291 - 299, 1983

133. Thomson, A. W., Moon, D. K., Inoue, Y., Geczy, C. L., Nelson, D. S.:
Modification of delayed-type hypersensitivity reactions to ovalbumin in cyclosporin A-treated guinea-pigs.
Immunology 48, 301 - 308, 1983

134. Tilney, N. L., Strom, T. B., MacPherson, S. G., Carpenter, C. B.:
Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats.
Transplantation, 20, 323 - 330, 1975

135. Tilney, N. L., Notis-McConarty, J., Strom, T. B.:
Specificity of cellular migration into cardiac allografts in rats.
Transplantation 26, 181 - 186, 1978

136. Titus, R. G., Chiller, J. M.:
A simple and effective method to access murine delayed-type hypersensitivity to proteins.
J. Immunol. Meth. 45, 65 - 78, 1981

137. Turner, E. V., Mansfield, J. M., Wallace, J. H.:
Effects of a xenogeneic lymphokine preparation on growth of B 16 melanoma in C57BL/6 mice.
Cell. Immunol. 61, 134 - 140, 1981

138. Tutschka, P. J., Beschorner, W. E., Allison, A. C., Burns, W. H., Santos, G. W.:
Use of cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation in the rat. Nature 280, 148 - 151, 1979

...

139. Ward, P. A., Unanue, E. R., Goralnick, S. J., Schreiner, G. F.:
Chemotaxis of rat lymphocytes.
J. Immunol. 119, 416 - 421, 1977

140. Weiss, S., Dennert, G.:
T cell lines active in the delayed-type hypersensitivity reaction (DTH).
J. Immunol. 126, 2031 - 2035, 1981

141. Wembacher, J., Senftleber, I., Gokel, J., Hammer, C., Brendel, W.:
Charakterisierung von lymphatischen Zellen aus natürlichen und künstlichen Allotransplantaten.
Langenbecks Arch. Chir. Forum (Suppl), 116 - 119, 1980

142. Wiener, J., Lattes, R. G., Spiro, D.:
An electron microscopic study of leucocyte emigration and vascular permeability in tuberculin sensitivity.
Am. J. Pathol. 50, 485 - 521, 1967

143. Wiener, S., Lendvai, S., Rogers, B., Urivetzky, M., Meilman, E.:
Nonimmune chemotaxis in vivo: Inhibition by complement depletion with cobra factor.
Am. J. Pathol. 73, 807 - 816, 1973

144. Wiktorowicz, K., Roberts, P. J., Häyry, P.:
Effector mechanisms in allograft rejection. IV. In contrast to late cytotoxic cells, the early killer cells infiltrating mouse sponge matrix allografts are predominantly T lymphocytes.
Cell. Immunol. 38, 255 - 263, 1978

145. Willebrand, E. von, Häyry, P.:
Composition and in vitro cytotoxicity of cellular infiltrates in rejecting human kidney allografts.
Cell. Immunol. 41, 358 - 372, 1978

...

146. Williams, T. W., Granger, G. A.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Correlation of derepression with release of lymphotoxin from human lymphocytes.
J. Immunol. 103, 170 - 178, 1969

147. Woodland, J., Vernon-Roberts, B., Swettenham, K. V., Currey, H. L. F.:
Comparison of the effects of alclofenac, flurbiprofens and prednisolone on acute inflammatory response in the rat.
Ann. Rheum. Dis. 36, 160 - 165, 1977

148. Yamamoto, S., Ishikura, A.:
Delayed hypersensitivity reactions in guinea-pigs using cotton pellets: Demonstration of macrophage migration inhibition activity in the cell free exudate.
J. Pathol. 127, 1 - 10, 1979

149. Zakarian, S., Billingham, R. E.:
Studies on normal and immune lymphocyte transfer reactions in guinea pigs,with special reference to the cellular contribution of the host.
J. Exp. Med. 136, 1545 - 1563, 1972

LEBENSLAUF

	Kerstin Christiane Elise Grete Thiede, geb. am 9.7.1954 in Bad Sachsa
April 1961 - März 1965	Besuch der Volksschule in Bartolfelde
April 1965 - Juli 1970	Besuch des Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasiums in Herzberg
Aug. 1970 - Mai 1973	Besuch des Osteroder Gymnasiums
10.5.1973	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
April 1973 - Juli 1974	Studium der Physik an der Technischen Universität Clausthal-Zellerfeld
Juli 1974 - März 1979	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 1979 - Okt. 1979	Anfertigung der Diplomarbeit an der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen, Abteilung Experimentelle Chirurgie und Immunologie unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. H. Bockhorn
30.10.1979	Diplomzeugnis
Nov. 1979 - April 1980	Anstellung als Biologin bei Laborarzt Dr. R. Seuffer in Tübingen

...

April 1980 - Mai 1984 Anfertigung der vorliegenden Dissertation an der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen, Abteilung Experimentelle Chirurgie und Immunologie unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. H. Bockhorn

Meine akademischen Lehrer waren:

Altendorf, Ammermann, Bader, Baron, Bentrup, Bessler, Bockhorn, Braun, Bunke, Drautz, Gaude, Guglielmi, Hadeler, Hantke, Hemmleben, Hopt, Kanne, Meyer, Oberwinkler, Rähle, Rundel, Schwemmle, Seiler, Seyfferth, Sperlich, Suhr, Weitzel, Wenk, Wöhrmann, Wolf, Wörtz, Zähner.